



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

CENTRO DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E INORGÂNICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ANA CAROLINE LUSTOSA DE MELO CARVALHO

**BIORREDUÇÃO DE CETONAS PRÓ-QUIRAIS
EMPREGANDO *Pseudomonas* sp ISOLADA na *Nopalea
cochenellífera* (L.) Salm-Dyck**

FORTALEZA-CEARÁ

2012

ANA CAROLINE LUSTOSA DE MELO CARVALHO

**BIORREDUÇÃO DE CETONAS PRÓ-QUIRAIS
EMPREGANDO *Pseudomonas* sp ISOLADA na *Nopalea
cochenellífera* (L.) Salm-Dyck**

Dissertação submetida ao programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como pré-requisito para obtenção do grau de Mestre em Química.

Área de concentração: Química Orgânica

Orientador: Prof. Dr. Marcos Carlos de Mattos

FORTALEZA-CEARÁ

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

-
- C321b Carvalho, Ana Caroline Lustosa de Melo.
Biorredução de cetonas pró-quirais empregando *Pseudomonas* sp isolada na *Nopalea cochenillifera* (L.) Salm-Dyck / Ana Caroline Lustosa de Melo Carvalho – 2012.
119 f. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Mestrado (Dissertação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciência, Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Mestrado em Química, Fortaleza, 2012.
Área de Concentração: Química Orgânica.
Orientação: Prof. PhD. Marcos Carlos de Mattos.
1. Biorredução. 2. *Pseudomonas* sp. 3. Álcoois Quirais. I. Título.

CDD 547


Esta Dissertação foi aprovada como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Química, área de concentração Química Orgânica, outorgada pela Universidade Federal do Ceará, em cuja Biblioteca de Ciências e Tecnologia/UFC encontra-se à disposição dos interessados.




Ana Caroline Lustosa de Melo Carvalho

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 17/08/2012

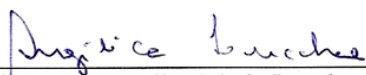
EXAMINADORES:



Prof. Dr. Marcos Carlos de Mattos
Universidade Federal do Ceará – UFC



Profa. Dra. Maria Conceição Ferreira de Oliveira
Universidade Federal do Ceará – UFC



Profa. Dra. Angélica Maria Lucchese
Universidade Estadual de Feira de Santana – UEFS

A Deus por sempre ter me guiado nessa jornada.
A minha mãe e minhas irmãs por sempre me apoiarem e por todo amor.
Aos amigos que fizeram meus dias mais felizes.

AGRADECIMENTOS

A Deus por todo amor, e por ter dado a oportunidade de realizar esse sonho, pelo seu amparo durante toda jornada, mostrando-me sempre os caminhos certos a serem seguidos e por nunca ter desistido de mim.

A minha mãe por ser meu porto seguro, pelo apoio nas minhas decisões, por todo amor, obrigada mãe pelas orações e por nunca ter deixado desanimar.

As minhas irmãs por sempre acreditarem em mim, por compreender e entender a minha ausência no seu cotidiano.

Ao Lucas por todo amor e cumplicidade.

Ao meu orientador Professor Marcos, que foi um pai nesses dois anos, por ter me acolhido, pela compreensão, incentivo, contribuições e ensino durante todo esse tempo e por toda paciência.

A Professora Vânia Melo e ao Departamento de Microbiologia- UFC, por sempre ajudar em experimentos e disponibilizar infra-estrutura para êxito deste trabalho.

Ao Daniel Araújo pelos primeiros ensinamentos no LABS, por ter trilhado todo caminho para o desenvolver desse trabalho.

A Natália, Barbára e James pelas análises de RMN e ensinamentos experimentais.

A Bruna por sempre estar ao meu lado durante essa batalha.

A família LABS, a todos tenho muito que agradecer : Thiago, Lívia, Emanuele, Leandro, Victor, Ingrid, Natália, James, Bárbara e em especial Reinaldo e Danielly por fazerem meus dias mais felizes e por sempre me incentivarem com suas palavras.

Ao Afonso pela boa companhia, sinceridade e ao Diego pela força.

Aos amigos Patrícia, Bruno obrigada pelo apoio e carinho.

Ao LBPN em especial a Juliana, Leonardo Alcantara, Felipe, Luciana Bertini e Leila por todo conhecimento repassado e por concederem alguns aparatos para este trabalho.

As meus amigos e familiares da minha terra Teresina- PI, Gustavo, Dani, Dalila, Lara, Lucas, Diego, Fernanda, Amália, Mylena por sempre me fazerem rir e suportar tanta saudade.

A minha Tia Perpétua por todo carinho e por sempre me acolher com palavras de incentivo durante essa etapa.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Química, em especial a Professora Maria da Conceição e Professora Telma Leda pela atenção e carinho, obrigada por contribuírem para minha formação.

Aos órgãos financiadores Funcap, CAPES e CNPQ.

MUITO OBRIGADA!

“Nas grandes batalhas da vida, o primeiro passo para a vitória é o desejo de vencer”

Mahatma Gandhi

RESUMO

Neste trabalho descrevemos o estudo do potencial biocatalítico de células íntegras de micro-organismos isolados de um vegetal da família das Cactaceas, *Nopalea cochenillifera* (L.) Salm-Dyck, popularmente conhecido como “palma doce” ou “palma forrageira”. Os micro-organismos foram isolados pela técnica de indução utilizando o substrato acetofenona. Dos quatro micro-organismo isolados (I-1, I-2, I-3, I-4) apenas o I-2, identificado como *Pseudomonas* sp, foi eficiente como biocatalisador na redução do substrato padrão acetofenona. As melhores condições para a realização da biorredução da acetofenona foram as seguintes: 1g de células em repouso de *Pseudomonas* sp, ressuspendidas em solução tampão de pH 7, temperatura de 28 °C e rotação de 175 r.p.m por 4 dias, com obtenção do (*S*)-1-feniletanol com conversão de 77% e *e.e.* de 89%. O estudo da biorredução, utilizando a cepa isolada de *Pseudomonas* sp, foi estendido para os seguintes derivados da acetofenona: 4-metóxi-acetofenona (2a), 4-metil-acetofenona (3a), 4-nitro-acetofenona (4a), 4-bromo-acetofenona (5a), 4-cloro-acetofenona (6a), 4-fluoro-acetofenona (7a), 3-metóxi-acetofenona (8a), 3-metil-acetofenona (9a), 3-nitro-acetofenona (10a), 2-metóxi-acetofenona (11a), 2-metil-acetofenona (12a), 2-nitro-acetofenona (13a), 2-bromo-acetofenona (14a), 2-cloro-acetofenona (15a), 2-fluoro-acetofenona (16a). Cabe ressaltar que todos os álcoois foram obtidos com seletividade Prelog (configuração *S*). Em geral, os melhores resultados foram obtidos para os derivados da acetofenona com substituintes metoxila, metila, nitro e bromo na posição – *orto* (*e.e.* de 94 a > 99% e conversão de 23 a 80%). Com relação aos substituintes cloro e flúor, os melhores resultados de seletividade e atividade enzimática foram obtidos para os derivados –*para* substituídos (*e.e.* 93% e conversão 73%; *e.e.* 83% e conversão de 51%, respectivamente).

Palavras-chave: Biorredução. *Pseudomonas* sp. Álcoois Quirais

ABSTRACT

Herein we describe the study biocatalytic potential of the whole cell of microorganisms isolated from a plant belonging to Cactacea family, *Nopalea cochenillifera* (L.) Salm- Dyck, popularly known as “palma doce” or “palma forrageira” . The microorganisms were isolated by induction technique using as acetophenone substrate. Among the microorganisms strains (I-1, I-2, I-3, I-4) only I-2, (*Pseudomonas* sp), was effective as biocatalyst in reducing the acetophenone. The best conditions for carrying out the bioreduction of acetophenone were as follows: 1g of resting cells of *Pseudomonas* sp, resuspended in buffer solution pH 7, at 28 ° C and rotation of 175 r.p.m for 4 days, obtaining the (*S*)-1-phenylethanol with conversion of 77% *e.e.* and 89%. The bioreduction study, using the *Pseudomonas* sp strain, was extended to the following derivatives of acetophenone, 4-methoxy-acetophenone (2a), 4-methyl acetophenone (3a), 4-nitro-acetophenone (4a), 4 -bromo-acetophenone (5a), 4-chloro-acetophenone (6a), 4-fluoro-acetophenone (7a), 3-methoxy-acetophenone (8a), 3-methyl acetophenone (9a), 3-nitro-acetophenone (10a) 2-methoxy-acetophenone (11a), 2-methyl acetophenone (12a), 2-nitro-acetophenone (13a), 2-bromo-acetophenone (14a), 2-chloro-acetophenone (15a), 2 - fluoro-acetophenone (16a). It is not worthy that all the alcohols were obtained with Prelog selectivity (*S* configuration). In general, the best results were obtained for the derivatives of acetophenone with substituent methoxyl, methyl, nitro and bromine in position - *ortho* (*e.e.* of 94 to > 99% conversion and 23-80%). With respect to the chlorine and fluorine substituents, the best results of selectivity and enzymatic activity were obtained for the – *para* substituted derivatives (*e.e.* 93% and 73% conversion, 83% *e.e.* and conversion of 51%, respectively).

Key Words: Bioreduction. *Pseudomonas* sp. Chiral alcohols.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Foto da Cactacea <i>Nopalea cochenillifera</i> Salm(L.) Dyck.	24
Figura 2- Foto do cultivo de <i>Pseudomonas</i> sp em placa de petri	25
Figura 3- Uso da biotecnologia em setores brasileiros	27
Figura 4-Enantiômeros com atividades diferenciadas	28
Figura 5-Exemplo de reação utilizando micro-organismo como biocatalisador	31
Figura 6- Esquema reacional da redução com <i>Cryptococcus laurenti</i>	32
Figura 7- Esquema da reação de esterificação usando micro-organismo.....	32
Figura 8- Esquema reacional da hidroxilação usando micro-organismo	33
Figura 9- Esquema da epoxidação utilizando micro-organismo	33
Figura 10- Esquema da reação de sulfoxidação usando micro-organismo	33
Figura 11- Esquema da reação de oxidação usando micro-organismo	33
Figura 12-Álcoois quirais com importância biológica	34
Figura 13-Redução de cetonas pró-quirais	35
Figura 14-Mecanismo de reação mediada por ADH e sua coenzima.....	36
Figura 15- Esquema reacional utilizando <i>Bacillus</i> na biorredução	36
Figura 16- Esquema reacional da transesterificação com <i>Pseudomonas areuginosas</i>	37
Figura 17-Biorredução usando bactérias	37
Figura 18- Esquema reacional da redução de α -ceto éster	37
Figura 19-Produto de biotransformação do limoneno.....	38
Figura 20-Álcoois padrões racêmicos, utilizados como padrões nas análises por cromatografia líquida de alta eficiência-CLAE	42
Figura 21- Reação de redução da acetofenona e derivados utilizando boro-hidreto de sódio .	43
Figura 22-Cromatograma da mistura reacional obtida da biorredução da acetofenona (1a) utilizando o micro-organismo I-2 com tempo de reação de 8 dias.....	45
Figura 23-Cromatograma da biorredução da acetofenona (1a) utilizando células em crescimento de I-2	47
Figura 24- Cromatograma da biorredução da acetofenona (1a) utilizando 1g de biomassa em sistemas de células em repouso	49
Figura 25-Cromatograma da biorredução da acetofenona (1a) utilizando 2g de biomassa em sistema de células em repouso.....	49
Figura 26-Cromatograma da biorredução da acetofenona (1a) utilizando células imobilizadas	50

Figura 27-Cromatograma da biorredução da acetofenona (1a) em pH 6	52
Figura 28-Cromatograma da biorredução da acetofenona (1a) em pH 7	52
Figura 29-Cromatograma da biorredução da acetofenona (1a) em pH 8	53
Figura 30-Cromatograma da biorredução da acetofenona (1a) a 23 °C	54
Figura 31-Cromatograma da biorredução da acetofenona (1a) a 28 °C	55
Figura 32-Cromatograma da biorredução da acetofenona (1a) a 33 °C	55
Figura 33-Cetonas pró-quirais selecionadas para reação de biorredução com micro-organismo I-2	56
Figura 34- Reação de biorredução utilizando cetonas aromáticas - <i>para</i> substituídas.....	57
Figura 35- Cromatograma da biorredução do derivado 4-metil-acetofenona (3a) utilizando micro-organismo I-2	58
Figura 36-Cromatograma da biorredução do derivado 4-cloro-acetofenona (6a) utilizando micro-organismo I-2	59
Figura 37- Cromatograma da biorredução do derivado 4-fluoro-acetofenona (6a) utilizando micro-organismo I-2	59
Figura 38-Cromatograma da biorredução do 4-metóxi-acetofenona (2a) utilizando micro-organismo I-2.....	60
Figura 39- Cromatograma da biorredução do derivado 4-nitr-acetofenona (4a) utilizando micro-organismo I-2.....	60
Figura 40- Cromatograma da biorredução do derivado 4-bromo-acetofenona (5a) utilizando micro-organismo I-2.....	61
Figura 42- Cromatograma da biorredução do derivado 3-metóxi-acetofenona (8a) utilizando micro-organismo I-2.....	63
Figura 43- Cromatograma da biorredução do derivado 3-metil-acetofenona (9a) utilizando micro-organismo I-2.....	63
Figura 45- Reações de biorredução utilizando cetonas aromáticas pró-quirais - <i>orto</i> substituídas	64
Figura 46- Cromatograma da biorredução do derivado 2-metóxi-acetofenona (11a) utilizando micro-organismo I-2	65
Figura 47-Cromatograma da biorredução do derivado 2-metil-acetofenona (12a) utilizando micro-organismo I-2	66
Figura 48- Cromatograma da biorredução do derivado 2-nitro-acetofenona (13a) utilizando micro-organismo I-2.....	66

Figura 49- Cromatograma da biorredução do derivado 2-bromo-acetofenona (14a) utilizando micro-organismo I-2	67
Figura 50- Cromatograma da biorredução do derivado 2-fluoro-acetofenona(16a) utilizando micro-organismo I-2	67
Figura 51- Cromatograma da biorredução do derivado 2-cloro-acetofenona (15a) utilizando micro-organismo I-2	68
Figura 52- Esquema reacional para preparação dos álcoois padrões	79
Figura 53- Curva de calibração para (\pm) 1-(4-metóxfenil)-etanol.....	79
Figura 54- Curva de calibração para (\pm) 1-(4-metilfenil)-etanol.....	79
Figura 55- Curva de calibração para (\pm) 1-(4-nitrofenil)-etanol.....	79
Figura 56- Curva de calibração para (\pm) 1-(4-bromofenil)-etanol.....	79
Figura 57- Curva de calibração para (\pm) 1-(4-clorofenil)-etanol.....	79
Figura 58- Curva de calibração para (\pm) 1-(4-fluorofenil)-etanol.....	79
Figura 59- Curva de calibração para (\pm) 1-(3-metóxfenil)-etanol.....	80
Figura 60- Curva de calibração para (\pm) 1-(3-metilfenil)-etanol.....	80
Figura 61- Curva de calibração para (\pm) 1-(3-nitrofenil)-etanol.....	80
Figura 62- Curva de calibração para (\pm) 1-(2-metóxfenil)-etanol.....	80
Figura 63- Curva de calibração para (\pm) 1-(2-metilfenil)-etanol.....	80
Figura 64- Curva de calibração para (\pm) 1-(2-nitrofenil)-etanol.....	80
Figura 65- Curva de calibração para (\pm) 1-(2-bromofenil)-etanol.....	81
Figura 66- Curva de calibração para (\pm) 1-(2-clorofenil)-etanol.....	81
Figura 67- Curva de calibração para (\pm) 1-(2-fluorofenil)-etanol	82

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1- Perfil de excesso enantiomérico e conversão da biorredução da acetofenona (1a) utilizando células em crescimento de I-2	47
Gráfico 2- Perfil do excesso enantiomérico e conversão da biorredução da acetofenona(1a) utilizando 1 g de biomassa de células em repouso.....	47
Gráfico 3- Perfil do excesso enantiomérico e conversão da biorredução da acetofenona(1a) utilizando 2 g de biomassa de células em repouso	48
Gráfico 4- Perfil do excesso enantiomérico e conversão da biorredução da acetofenona utilizando células imobilizadas em alginato de sódio.	50
Gráfico 5- Perfil do excesso enantiomérico e conversão utilizando solução tampão com diferentes valores de pH	51
Gráfico 6- Perfil do excesso enantiomérico e conversão na biorredução da acetofenona utilizando diferentes temperaturas	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Formas como os biocatalisadores podem ser utilizados.....	30
Tabela 2- Excesso enantiomérico e conversão na redução de α -ceto éster	37
Tabela 3- Rendimentos dos álcoois racêmicos 1b-16b	43
Tabela 4- Resultados da biorredução utilizando micro-organismos isolados da <i>Nopalea Cochenellífera</i> (L.) Salm Dyck, com tempo de reação de 8 dias	44
Tabela 5- Resultados obtidos utilizando micro-organismo I-2 na biorredução de cetonas aromáticas substituídas na posição <i>-para</i>	58
Tabela 6- Resultados obtidos utilizando micro-organismo I-2 na biorredução de cetonas aromáticas substituídas na posição <i>-meta</i>	62
Tabela 7- Resultados obtidos utilizando micro-organismo I-2 na biorredução de cetonas aromáticas substituídas na posição <i>-orto</i>	65
Tabela 8- Parâmetros de análise por CLAE dos substratos e produtos das reações de biorredução	74

LISTA DE ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de Etila
BDA	Batata Dextrose Ágar
BD	Batata Dextrose
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
<i>c</i>	Conversão
CC	Coluna Cromatográfica
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CENAUREMN	Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear
<i>e.e.</i>	Excesso enantiomérico
HEX:IPA	Hexano:Isopropanol
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleótideo
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleótideo Fostato
Φ	Diâmetro

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE GRÁFICOS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1.0 INTRODUÇÃO.....	21
2.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	24
2.1 Considerações sobre <i>Nopalea cochenillifera</i> (L.) Salm-Dyck.....	24
2.2 Considerações sobre <i>Pseudomonas</i> sp.....	25
2.3 Biocatálise.....	26
2.4 Biocatalisadores.....	28
2.5 Álcoois quirais.....	34
2.6 Isolamento de micro-organismos.....	38
3.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
3.1 Preparação dos álcoois padrões.....	42
3.2 Coleta da planta.....	44
3.3 Isolamento induzido e triagem dos micro-organismos.....	44
3.3 Otimização dos processos biocatalíticos utilizando micro-organismo I-2.....	45
3.3.1 Otimização dos meios reacionais.....	46
3.3.1.1 Células em crescimento.....	46
3.3.1.2 Células em repouso.....	47
3.3.1.3 Células imobilizadas.....	49
3.3.2 pH do meio reacional.....	51
3.3.3 Temperatura.....	53
3.4 Reação de biorredução utilizando derivados da acetofenona.....	55
3.4.1 Cetonas aromáticas <i>-para</i> substituídas.....	57
3.4.2 Cetonas aromáticas <i>-meta</i> substituídas.....	61
3.4.3 Cetonas aromáticas <i>-orto</i> substituídas.....	64

4.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS	70
5.0 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	72
5.1 Material utilizado.....	72
5.2 Métodos de análise	72
5.3 Polarímetro	72
5.4 Cromatografia de camada delgada	72
5.5 Cromatografia em coluna	73
5.6 Cromatografia líquida de alta eficiência-CLAE.....	73
5.7 Ressonância Magnética Nuclear-RMN	74
5.8 Espectroscopia na Região do UV/VIS	74
5.9 Esterilização e meio de cultura.....	75
6.0 PROCESSOS BIOCATÁLITICOS.....	75
6.1 Coleta da amostra para isolamento dos micro-organismos	75
6.2 Meio de cultura empregado	75
6.3 Isolamento dos micro-organismos.....	76
6.4 Conservação dos micro-organismos.....	76
6.5 Procedimento de otimização da biorredução.....	76
6.5.1 Triagem dos micro-organismos utilizando células íntegras em crescimento.....	76
6.5.2 Meio reacional	77
6.5.2.1 Células íntegras em crescimento do micro-organismo I-2 isolado do cacto	77
6.5.2.2 Células íntegras em repouso do micro-organismo I-2 isolado do cacto.....	77
6.5.2.3 Células imobilizadas do micro-organismo I-2 isolado do cacto.....	77
6.5.3 Meio tamponante: pH 6,0; 7,0 e 8,0	78
6.5.4 Temperatura da reação: 23 °C, 28 °C e 33 ° C.....	78
6.6 Substratos selecionados nas reações de biorredução utilizando o micro-organismo I-2....	78
6.7 Obtenção dos álcoois padrões por via química	79
6.8 Procedimento para calcular o excesso enantiomérico e conversão	79

7.0 REFERÊNCIAS	88
-----------------------	----

ANEXOS

Capítulo 1

Introdução

1.0 INTRODUÇÃO

Os termos biocatálise e biotransformação referem-se a processos em que se utiliza um catalisador biológico, no qual um composto orgânico é convertido ao produto final por um número limitado de etapas enzimáticas, sendo a enzima o principal agente dessa reação. Nos últimos anos estes processos biocatalíticos são um dos campos mais promissores dentro de novas tecnologias para síntese de compostos de alto valor agregado.

A biocatálise se tornou importante pelas transformações de compostos orgânicos em produtos opticamente ativos, com alta estereosseletividade e em condições ambientais limpas, na qual utiliza catalisadores advindos de células vegetais, animais ou micro-organismos (ANDRADE *et al.*, 2004).

A quiralidade molecular tem um papel central na química orgânica, pois moléculas quirais são precursores, em síntese assimétrica, de compostos orgânicos biologicamente ativos (CAPOZELLO; LATTANZI, 2003). Devido à natureza quiral, os biocatalisadores são predominantemente adequados para produção de compostos enantiomericamente puros. Além disso, os processos biocatalíticos provaram ser mais “verdes”, menos poluentes e perigosos (BENCZE *et al.*, 2010).

Os biocatalisadores podem ser divididos em duas categorias: células íntegras ou enzimas isoladas. A primeira usa seu metabolismo para regenerar cofatores e algumas enzimas isoladas (exemplo: álcool desidrogenase) precisam de um fornecimento de cofator externo (VALADEZ-BRANCO; LIVINGSTON, 2009).

Dentre as reações catalisadas por enzimas, a redução é uma das mais importantes e com aplicações nas indústrias farmacêutica, agroquímica e cosmético-fragrância (GOTOR; ALFONSO; GARCIA-URDIALES, 2008). Células microbianas íntegras podem ser empregadas para redução de cetonas, através da ação enzimática da álcool desidrogenase (FABER, 2000).

O uso de micro-organismos para biorredução de compostos orgânicos, que favorece a obtenção de produtos enantiomericamente puros, tem crescido nos últimos anos. Fato esse que se associa às transformações biocatalíticas que são vistas como uma tecnologia competitiva que faz o uso dos paradigmas ambientais sustentáveis, pois a obtenção de produtos enantiomericamente puros é uma questão de desenvolvimento para as indústrias farmacêuticas e agroquímicas (FESSER; JONES, 2001).

Cabe ressaltar que a triagem de micro-organismos, que vivem em nosso ambiente, é um método eficiente para obtenção de biocatalisadores que possuam características

satisfatórias para várias reações (esterificação, hidroxilação, oxidação, redução, dentre outras).

Neste trabalho, a triagem de micro-organismos foi realizada utilizando, como fonte de micro-organismos, um vegetal da família Cactacea, que segundo Araújo *et al.* (2005) são materiais higroscópicos capazes de reter, eliminar ou absorver água. Tais características são fatores preponderantes para o crescimento de micro-organismos, aliados à composição química do referido vegetal, como por exemplo, a quantidade de substâncias glicogênicas, em torno de 37% de sua polpa, aumentando a possibilidade de conter grande quantidade de micro-organismos. Cabe lembrar que os micro-organismos usam a glicose e a frutose como fonte de carbono e alimento energético.

Este trabalho teve como objetivo o isolamento de micro-organismos capazes de realizar reações de biorredução enantiosseletiva de cetonas aromáticas, bem como realizar o aperfeiçoamento dos processos biocatalíticos, analisando as condições reacionais, e avaliando a enantiosseletividade e a atividade enzimática nas reações de biorredução de cetonas aromáticas pró-quirais. Os álcoois secundários obtidos nas biorreduções possuem grande versatilidade sintética, pois são amplamente utilizados como intermediários na indústria farmacêutica e agroquímica.

O trabalho apresenta ainda os seguintes capítulos: 2. Revisão Bibliográfica 3. Considerações Taxonômicas (sobre *Nopalea cochenillifera* (L.) Salm-Dyck e *Pseudomonas* sp); 4. Resultados e Discussão; 5. Considerações Finais; 6. Procedimento Experimental.

Revisão Bibliográfica

Capítulo 2

2.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Considerações sobre *Nopalea cochenillifera* (L.) Salm-Dyck

Nopalea cochenillifera (L.) Salm-Dyck, Figura 1, é uma planta da família Cactacea, sendo uma angiosperma dicotiledônea e xerófita, caracterizada por ser um arbusto suculento, ereto e bastante ramificado, atingindo até 1,7 m de altura, originária da América Latina (REIS, 2009).

Figura 1- Foto da Cactacea *Nopalea cochenillifera* Salm(L.) Dyck.



Fonte: Próprio Autor

No Nordeste brasileiro existem cerca de 400 mil hectares cultivados com espécies da família Cactacea, pois essa planta apresenta características apropriadas à região quente e seca (SANTOS *et al.*, 1994). No Brasil, *N. cochenillifera* é conhecida como “palma doce” ou “palma forrageira”, é cultivada no Nordeste na região do semi-árido, principalmente pelos fazendeiros de gado, sendo que as maiores áreas de cultivos são encontradas nos Estados de Alagoas, Pernambuco e Paraíba. A *N. cochenillifera* tem sido largamente utilizada como fonte de suplemento alimentar no período da estiagem nordestina, devido a grande quantidade de água, minerais e proteínas (VASCONCELOS *et al.*, 2007).

Sanglard e Melo (2001) afirmam que a palma forrageira, como é conhecida *N. cochenillifera*, pode ser usada na alimentação humana e animal, assim como na indústria de cosméticos e na agroindústria; no uso medicinal pode ser usada no combate a obesidade, como diurético, no combate a diarreia e como anti-inflamatório.

2.2 Considerações sobre *Pseudomonas* sp

Pseudomonas sp é uma bactéria pertencente à classe Grammproteobacteria, ordem Pseudomonadales e a família das Pseudomonadaceae (OLIVEIRA, 2008).

O gênero *Pseudomonas* foi descrito em 1894 e é um dos gêneros mais diversos e onipresentes, cujas espécies foram isoladas em todo mundo e em todos os tipos de ambientes, desde a Antártida até a região dos trópicos. Tal gênero pode ser encontrado em sedimentos, amostras clínicas, plantas, fungos, espécies de animais doentes, água, solo, rizosfera (raízes), mar e desertos, e podem fazer parte da microbiota normal do trato intestinal e pele de 3-5% da população (PEIX; RAMIREZ-BAHENA; VELAQUEZ, 2009).

As *Pseudomonas* são micro-organismos oportunistas, quimiorganotróficas, que obtêm energia a partir de compostos orgânicos, são bacilos retos ou levemente curvos, sem esporos, apresentando necessidades nutricionais bem simples, possuindo coloração de suas colônias branca, creme ou cinza claro, Figura 2 (MADIGAN *et al.*,2010).

Figura 2- Foto do cultivo de *Pseudomonas* sp em placa de petri



Fonte: Próprio Autor

A característica marcante desse gênero é sua capacidade de utilizar diferentes compostos como fontes de carbono e energia, podendo ser fitopatogênica, além de possuir espécies epífitas (bactérias capazes de viver e multiplicar em superfícies de plantas) e saprófitas (bactérias decompositoras), cujos *habitats* são a rizosfera, o solo, a superfície de plantas, os restos de cultura e água. As bactérias desse gênero são geralmente resistentes a muitos antibióticos (cloranfenicol) e desinfetantes, assim como podem produzir potentes antibióticos (TAVARES, 1996; FILHO *et al.*,1995).

2.3 Biocatálise

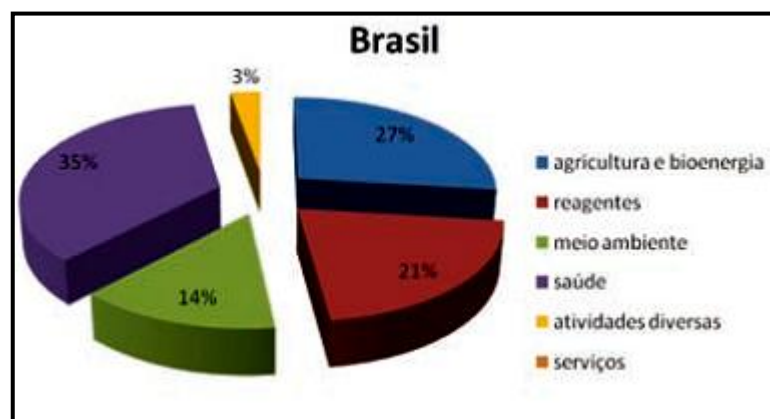
A biocatálise e biotransformação teve sua origem nos primórdios da civilização quando o homem primitivo se utilizava de processos fermentativos para transformar uma matéria em outra. Fontes literárias como a bíblia e os monumentos egípcios registram a fermentação alcoólica e o preparo de pães (VIEIRA, 2006). Porém foi Pauster, no século XIX, que fez associação dos micro-organismos e os fenômenos químicos. Buchner descobriu que um extrato de células livres de micro-organismos leva a fermentação (MARSAIOLI; PORTO, 2010).

Nos dias atuais, biotransformação é definida como transformações químicas regioseletivas e estereoespecíficas catalisadas por sistemas biológicos através de enzimas eficazes (BARNEJEE; SINGH; RAHMAN, 2012). A biocatálise emergiu como uma alternativa aos processos químicos tradicionais para a produção de compostos químicos e farmacêuticos em grande escala (WANG; SI; ZAHO, 2012).

A biocatálise tem se consolidado como uma tecnologia importante na indústria voltada para Química Fina. O aumento por processos industriais ambientalmente limpos, bem como a necessidade crescente por rotas sintéticas estereosseletivas, chamou a atenção de muitos químicos orgânicos para a biocatálise (RODRIGUEZ *et al.*, 2011).

Nos últimos anos, observou-se um crescimento no número de empresas químicas que adotaram a biocatálise como metodologia para produção do estereoisômero desejado, principalmente na síntese de compostos enantiomericamente puros, que tem sua relevância associada à indústria farmacêutica e agroquímica (MARSAIOLI; PORTO, 2010). A Figura 3 representa o uso da biotecnologia, em um contexto mais amplo, em vários setores no Brasil (OLIVEIRA; MANTOVANI, 2009).

Figura 3- Uso da biotecnologia em setores brasileiros

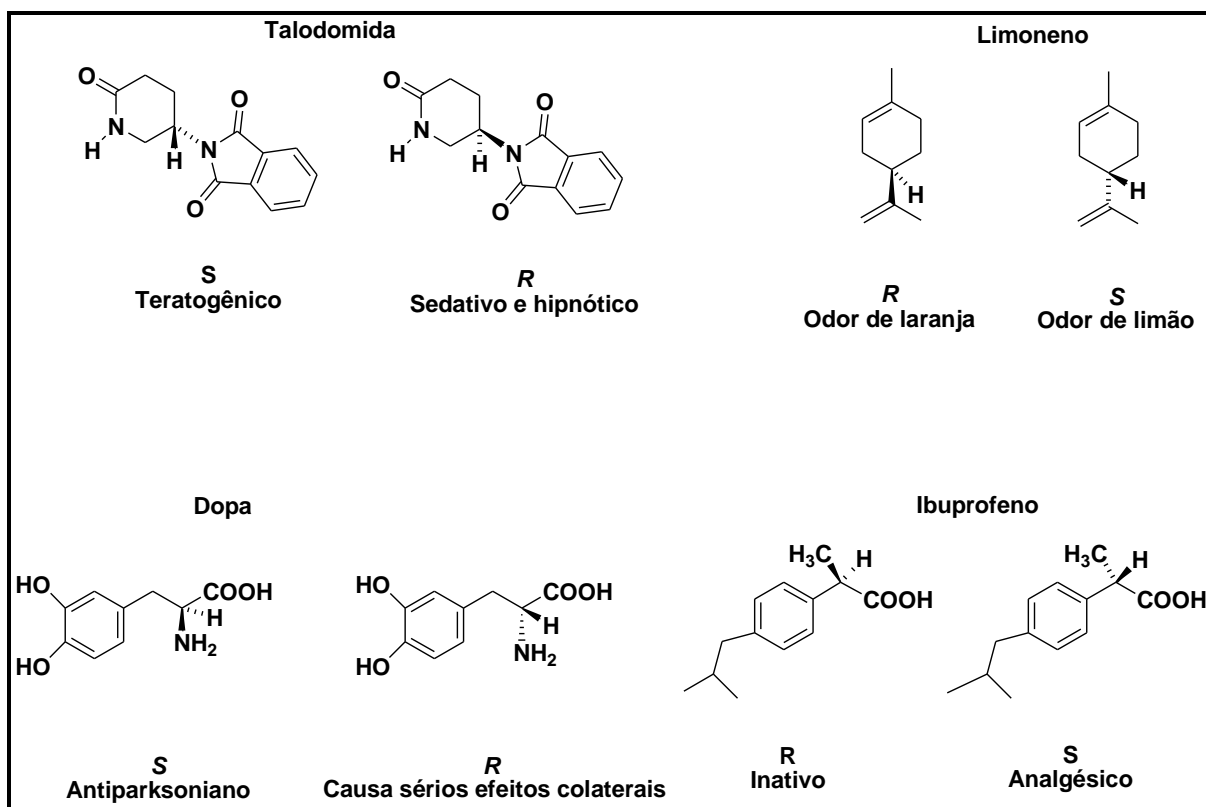


Fonte: OLIVEIRA; MANTOVANI, 2009.

Nesse gráfico, destaca-se uma maior porcentagem do uso da biotecnologia na saúde e agricultura, devido ao fato do Brasil ter sido um pioneiro na produção de insulina usando técnicas de recombinação (OLIVEIRA; MANTOVANI, 2009).

Pode ser retratado que a biocatálise também emergiu através da tragédia do fármaco talidomida, devido a diferenciação da atividade de cada enantiômero, em que o enantiômero *R* foi utilizado no tratamento de náuseas, muito comum no período inicial da gravidez, porém o seu enantiômero *S* leva a má formação congênita (COELHO, 2001). Outros fármacos que tem atividade diferenciada para cada enantiômero são apresentados na Figura 4 (SILVA, 2011).

Figura 4-Enantiômeros com atividades diferenciadas



Assim, a biotransformação é uma ferramenta alternativa de grande potencial, especialmente para o desenvolvimento de tecnologias sustentáveis para produção de produtos químicos e de drogas, compatíveis com a “química verde” (ILLANES *et al.*, 2012).

2.4 Biocatalisadores

Os biocatalisadores são catalisadores naturais, enzimas, que podem ser advindas de células íntegras de animais, vegetais ou micro-organismos (NAKAMURA *et al.*, 2003).

A palavra enzima foi introduzida por Khne, no século XIV, porém Berzelius cinquenta anos antes, tinha reconhecido a presença de fermentos de ocorrência natural que promoviam reações químicas, surgindo o conceito de catalisador biológico (biocatalisador) (MOTTA, 2007).

Enzimas são proteínas de grande complexidade estrutural que atuam como catalisadores na maioria das reações químicas que ocorrem no metabolismo celular. São constituídas por resíduos de aminoácidos unidos através de ligações peptídicas. Essas macromoléculas exercem funções vitais nos organismos vivos, e dependendo de sua atividade

biológica e do organismo em que foram sintetizadas apresentam características bem peculiares (ROCHA, 2008).

O micro-organismo mais popular utilizado como biocatalisador pelos químicos orgânicos é a *Saccharomyces cerevisiae* (conhecido como fermento de pão, de padaria ou de padeiro). Vários são os motivos para este sucesso destacando-se a alta enantiosseletividade, rendimentos químicos compatíveis, a ampla disponibilidade, baixo custo, e pelo fato de não requerer adição de dispendiosos cofatores, pois estão disponíveis nas células (RODRIGUES; MORAN, 2001).

Atualmente, centenas de enzimas são utilizadas em processos industriais, sendo que aproximadamente metade são provenientes de fungos, mais de um terço são provenientes de bactérias e o restante provenientes de animais (8%) e plantas (4%). Cabe ressaltar que mais de quinhentos produtos comerciais são produzidos com uso de enzimas (SANCHEZ; DEMIAN, 2011).

O biocatalisador pode ser utilizado na forma de enzima isolada ou células íntegras (de animais, vegetais e micro-organismos). A forma de utilização do biocatalisador dependerá do tipo de reação, da escala que a reação será realizada e se há necessidade de cofatores, Tabela 1 (FABER, 2000).

Tabela 1- Formas como os biocatalisadores podem ser utilizados

Enzima Isolada	Aparelhagem simples, enzima é adicionada diretamente no meio reacional, alta especificidade, maior produtividade e facilidade de isolamento de produtos, porém os fatores custo, aquisição, regeneração dos cofatores podem inviabilizar o processo;
Células íntegras em crescimento	Os substratos são adicionados ao meio de cultura juntamente com a inoculação ou durante fase de crescimento, não é necessário adição de cofator, produção de grande quantidade de biomassa;
Células em repouso	O micro-organismo é cultivado até o seu crescimento ótimo e em seguida a biomassa é filtrada ou centrifugada e ressuspensa em solução ou solventes adequados; ocorre menos formação de sub-produtos;
Células imobilizadas	As células estão ligadas a suportes inertes insolúveis por meios físicos ou químicos, podendo haver o possível reuso das células;

Fonte: FABER, 2000.

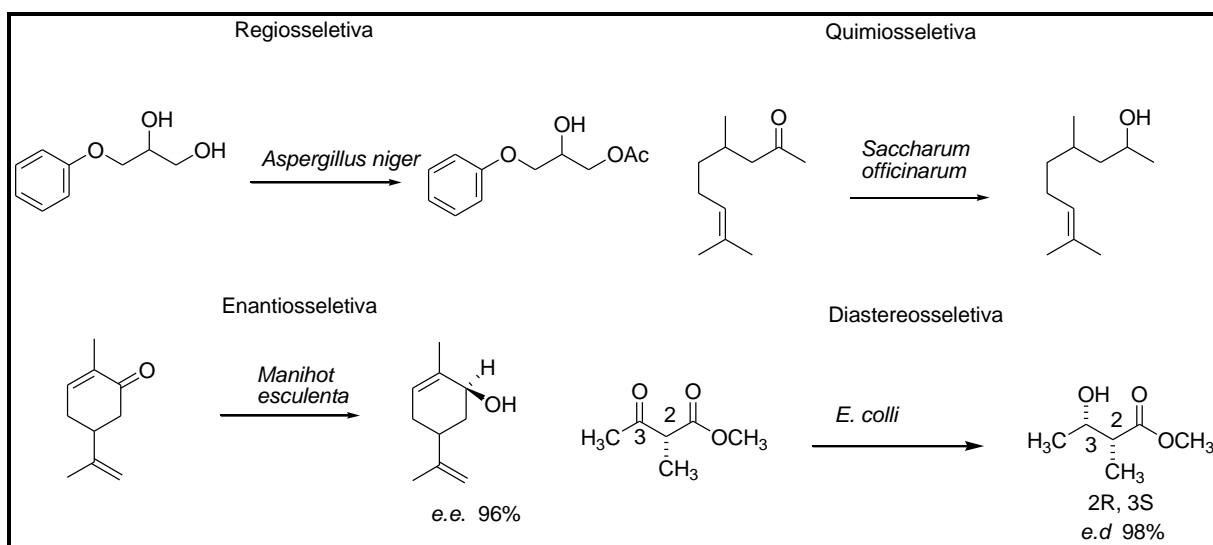
As enzimas apresentam várias propriedades que as tornam atrativas como catalisadores para biotransformações, dentre elas destaca-se a versatilidade, existindo um processo enzimático para cada tipo de reação orgânica. Na literatura é relatado que mais de 3.000 enzimas têm sido identificadas e muitas isoladas em sua forma pura (VECCHIA-DALLA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004).

Os biocatalisadores, que são enzimas, podem ser utilizados nas indústrias, para modificação de moléculas complexas, uma opção cada vez mais frequente, devido as seguintes vantagens:

a. A alta seletividade – podendo ser dividida em: (i) quimiosseletiva, que age em um único tipo de função, permanecendo as demais funções inalteradas, Figura 5; (ii) regiosseletiva, devido a sua complexa estrutura tridimensional, as enzimas pode distinguir entre grupos funcionais que são situados quimicamente em regiões diferente da mesma

molécula do substrato, Figura 5; (iii) enantiosseletiva e diastereosseletiva, devido ao fato de as enzimas serem constituídas a partir de L-aminoácidos, o que as caracteriza como catalisadores quirais, propiciando a transformação de substratos pró-quirais em compostos opticamente ativo, Figura 5 (MEEN, BARNEJEE, 2012; SAKAMAKI *et al.*, 2004; ASSUNÇÃO *et al.*, 2008; STEWART, 2000).

Figura 5-Exemplo de reação utilizando micro-organismo como biocatalisador



b. São catalisadores eficientes, pois aceleram as reações de 10^8 a 10^{10} vezes mais, quando comparadas com reações não enzimáticas correspondentes. Como consequência, pode-se utilizar pequenas quantidades de catalisadores biológicos quando comparados aos catalisadores químicos (BARROS, 2009).

c. Condições brandas, agem em pH em torno de 7, em temperaturas preferencialmente em torno de 30 °C, o que minimiza a ocorrência de reações indesejadas.

d. Ambientalmente aceitáveis, são reagentes benignos ambientalmente, desde que sejam completamente biodegradáveis.

Dentre as desvantagens dos biocatalisadores destaca-se:

e. Biocatalisadores podem não ser suficientemente estáveis ao meio desejado, em condições extremas de temperatura e valores de pH, pode ocorrer a desativação da enzima;

f. Alguns biocatalisadores necessitam da adição de cofatores, o que eleva o custo dos processos biocatalíticos;

g. Existem poucos biocatalisadores para reações desejadas a partir de substrato disponível e produto direcionado, pois muitos biocatalisadores ainda não foram caracterizados

e não estão disponíveis comercialmente. No entanto, já existem em torno de mais de 4000 conhecidos (BOMMARIUS; RIEBEL, 2004).

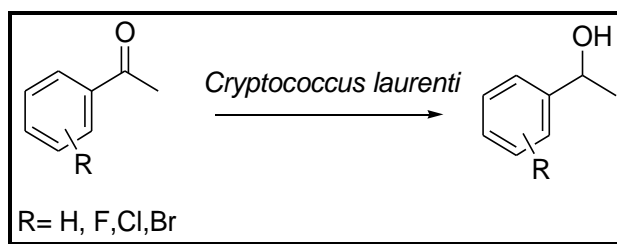
As enzimas de origem microbianas são, muitas vezes, mais úteis que enzimas de plantas ou de animais, devido à grande variedade de atividades catalíticas disponíveis, o alto rendimento, facilidade de manipulação genética e rápido crescimento em meios de baixo custo (HASAN *et al.*, 2006).

Os micro-organismos têm sua relevância devido ao curto período de geração e a grande diversidade, levando a possibilidades ilimitadas quanto ao uso como biocatalisadores, bem como quanto à quantidade de enzimas envolvidas (CARVALHO *et al.*, 2005).

Existem vários relatos sobre uso de micro-organismos como biocatalisadores para realização de várias reações, como exemplo:

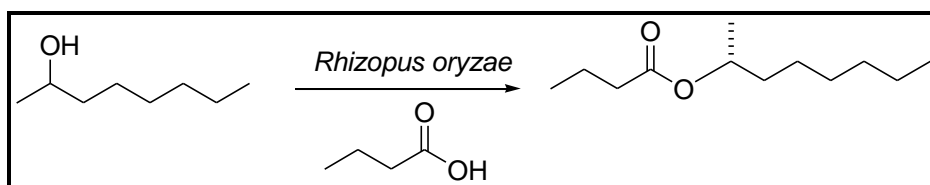
a. Na redução assimétrica de cetonas usando cepas de *Cryptococcus laurenti* com excesso enantiomérico de até 99% e conversão de até 100% para todos os substratos apresentados na Figura 6 (KURBANOGLU, ZILLBEYAZ, KURBANOGLU, 2011).

Figura 6- Esquema reacional da redução com *Cryptococcus laurenti*



b. Esterificação do 2-octanol racêmico com ácido butírico usando cepas de *Rhizopus oryzae* com excesso enantiomérico de 97% do enantiômero *R* e conversão de 35%. (GANDOLFI *et al.*, 2001) Figura 7.

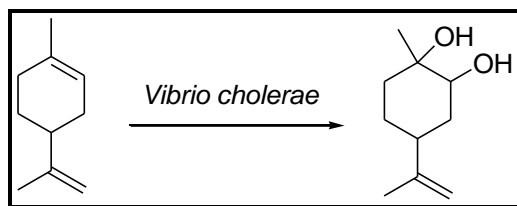
Figura 7- Esquema da reação de esterificação usando micro-organismo



c. Hidroxilação, sendo o biocatalisador bactérias marinhas (HOUJIN *et al.*, 2006)

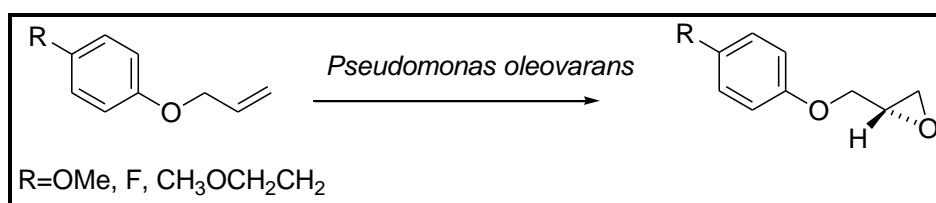
Figura 8.

Figura 8- Esquema reacional da hidroxilação usando micro-organismo



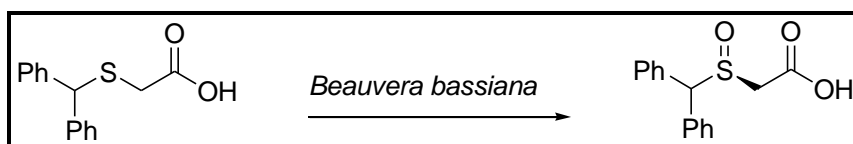
d. Epoxidação quiral com *Pseudomonas oleovorans* com excessos enantioméricos de 98-99% e conversão de aproximadamente 20% (LIN *et al.*, 2011), Figura 9.

Figura 9- Esquema da epoxidação utilizando micro-organismo



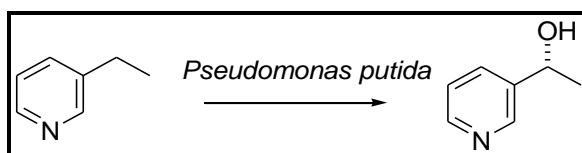
e. Sulfoxidação com cepa de *Beauveria bassiana* com rendimento de 89% e com excelente enantiosseletividade de 99% (BORGES *et al.*, 2009), Figura 10.

Figura 10- Esquema da reação de sulfoxidação usando micro-organismo



f. Oxidação com cepa de *Pseudomonas putida* com excesso enantiomérico de 90% e rendimento de 30% (MATSUDA; YAMANAKA; NAKAMURA, 2009), Figura 11.

Figura 11- Esquema da reação de oxidação usando micro-organismo

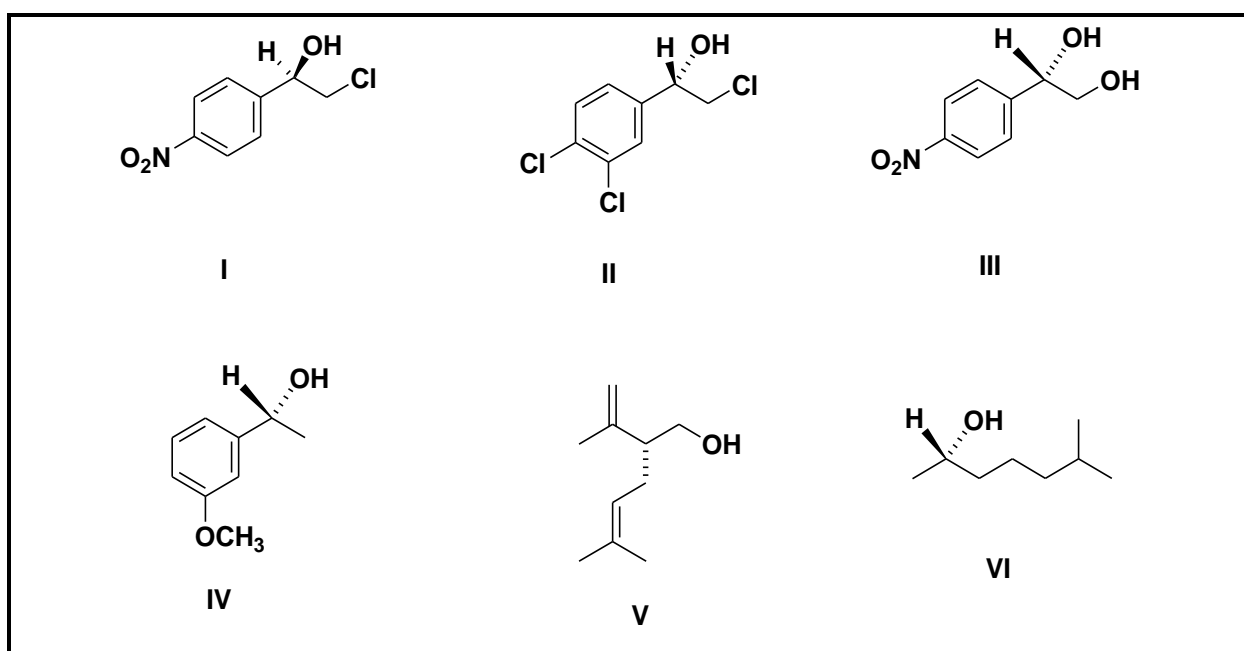


2.5 Álcoois quirais

Os álcoois quirais servem como precursores e como auxiliares quirais. São uma importante classe de compostos orgânicos, devido às suas propriedades bioativas e materiais de partida para a síntese de várias moléculas complexas, biologicamente ativas (VIERA *et al.*, 2010; CAPOZELLO; LATTANZI, 2003).

Os álcoois quirais são utilizados como bloco de construção quiral “*chiral building blocks*” e sua relevância está associada à indústria farmacêutica. Como exemplos podem ser citados os álcoois (*R*)-1-(4-nitrofenil)-2-cloro-etanol (**I**), (*S*)-1-(3,4-diclorofenil)-2-cloro-etanol (**II**), (*S*)-1-(4-nitrofenil)etanodiol (**III**), que são bloco de construção quiral para preparação de drogas α - β adrenérgicas como sertralina, nifenalol, e sotalol, respectivamente. Destaca-se também na indústria farmacêutica o álcool (*S*)-1-(3-metóxilfenil)-etanol (**IV**) que é precursor do fármaco rivastigmina que ajuda no tratamento de pacientes com demência leve. Na indústria de perfumes pode ser citado o (*R*)-lavandulol (**V**) e na síntese de produtos naturais pode ser destacado o (*S*)-(+)-sulcatol (**VI**), Figura 12 (RODRIGUES *et al.*, 2001; TEMBA; OLIVEIRA; DONNICI, 2003; XU *et al.*, 2010).

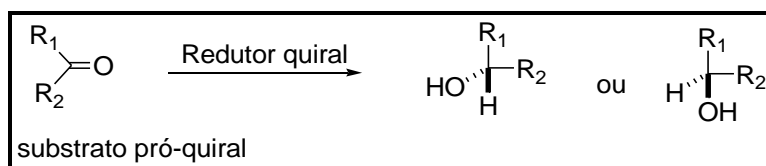
Figura 12-Álcoois quirais com importância biológica



A obtenção de álcoois quirais pode ser realizada por uma reação usando um composto carbonílico pró-quiral e um agente redutor quiral, Figura 13. Entre esses agentes

redutores quirais podem ser citados BINAL-H, alpino borano, complexos de rutênio, ródio e outros metais associados a ligantes quirais, porém essa seria obtenção por via química com a desvantagem de ser prejudicial ao meio ambiente. Além disso, utiliza-se compostos que são tóxicos, assim como resultam em rendimentos baixos, levando a custos elevados e necessitando de condições específicas (SCHAFER *et al.*, 2010; TEMBA; OLIVEIRA; DONNICI, 2003; ALCANTARA; BARROSO; PILO-VELOSO, 2002).

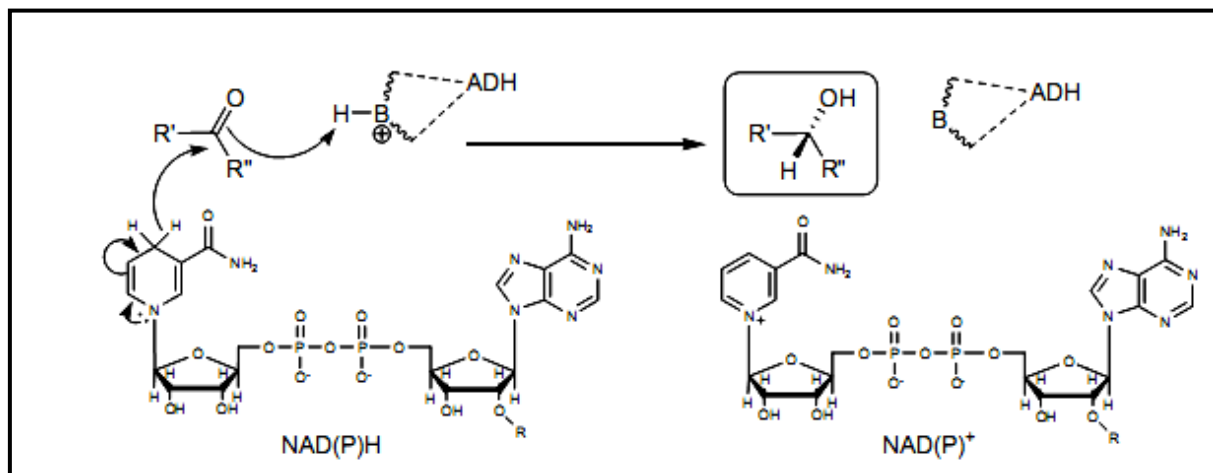
Figura 13-Redução de cetonas pró-quirais



A redução de grupos carbonílicos por via enzimática para obtenção de álcoois quirais, tem a vantagem de ser ambientalmente benigna e fazer uso de condições limpas. A redução enzimática de grupos carbonílicos representa uma das reações mais importantes na síntese de álcoois quirais. As enzimas que podem ser utilizadas para biorredução de grupos carbonílicos são a desidrogenase e oxido-redutase, que requerem a presença da coenzima (cofator) NADH ou NADPH que transferem o hidreto para o composto carbonílico, sendo assim formado NAD^+ ou $NAPH^+$. O papel da enzima desidrogenase é proporcionar uma interação do substrato com o cofator de forma, termodinamicamente, favorável para a ocorrência da reação, Figura 14 (JURCEK, WIMMEROVA, WIMMER, 2008).

Na concepção do processo de biorredução para obter álcoois quirais, células íntegras de micro-organismos podem ser vantajosamente utilizadas, já que essas são fonte de cofator, que é um produto muito caro, e o processo de reciclagem do cofator é realizado automaticamente pela célula, para obtenção do produto final. Dentro desse processo as enzimas e os cofatores estão bem protegidos pelo ambiente celular (YAN *et al.*, 2011; XU *et al.*, 2010; BARBIERI, 2001).

Figura 14-Mecanismo de reação mediada por ADH e sua coenzima

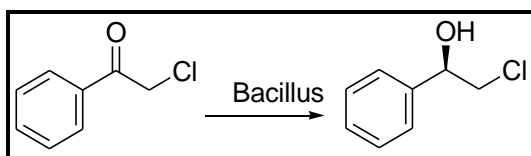


R=H (NADH) ou R=PO₃²⁻ (NADPH); ADH= álcool desidrogenase , B= resíduo de aminoácido da enzima

Fonte: ANDRADE, 2008.

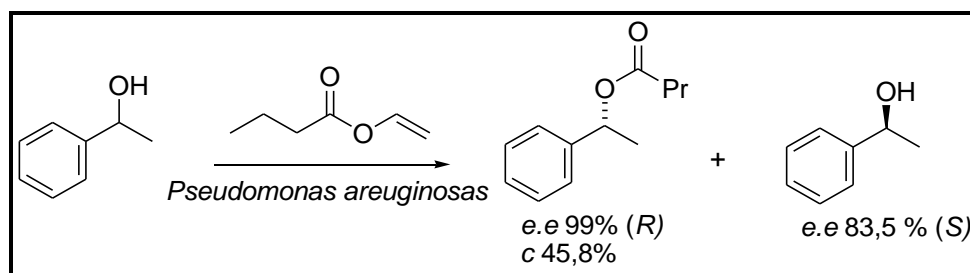
A cultura de célula bacteriana em biocatálise ou biotransformação para produção de álcoois enantiomericamente puros tem ganhado espaço nos últimos anos. Xie, Xu e Xu, (2010), realizaram o estudo de estirpe de *Bacillus* isolados de solo, com enzima redutase, com alta tolerância ao substrato 2-cloro-1-feniletanona, resultando na biorredução em 2-cloro-1-feniletanol com alto excesso enantiomérico (99%) e conversão de 93,3% (Figura 15).

Figura 15- Esquema reacional utilizando *Bacillus* na biorredução



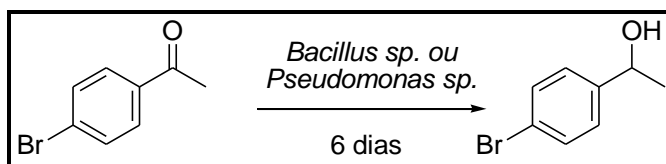
Singh e colaboradores, em 2010 realizaram a resolução cinética do 1-feniletanol racêmico via transesterificação utilizando butirato de vinila em hexano e lipase de *Pseudomonas aeruginosa*, obtendo excelentes resultados: conversão de 45,8% e excesso enantiomérico do produto em 99% (enantiômero *R*) e excesso enantiomérico do substrato de 83,5% e enantiosseletividade de 526,28 (Figura 16).

Figura 16- Esquema reacional da transesterificação com *Pseudomonas areuginosas*



O uso de bactérias em biorredução é relatado por Andrade *et al.* (2005) com a utilização de cepas isoladas de sedimentos. Foram obtidos bons resultados para o derivado da acetofenona 1-(4-bromofenil)etan-1-ol, quando se utilizou como biocatalisador a bactéria *Bacillus sp.*, excesso enantiomérico de 99% e conversão de 90% e com *Pseudomonas sp.* excesso enantiomérico de 80% e conversão de 99% (Figura 17).

Figura 17-Biorredução usando bactérias



Ishihara e colaboradores, em 2003, utilizaram como fonte de biocatalisador várias cepas de bactérias termofílicas, para redução de α -cetoésteres com *e.e.* entre 84 - > 99% e conversão entre 44-77% Figura 18 e Tabela 2.

Figura 18- Esquema reacional da redução de α -ceto éster

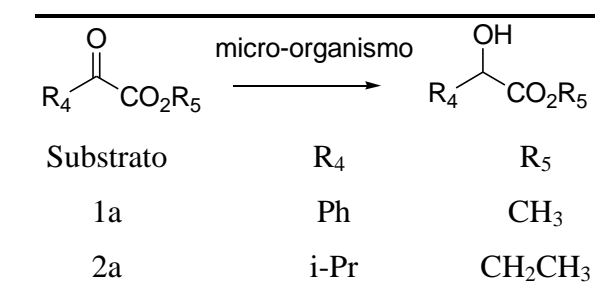
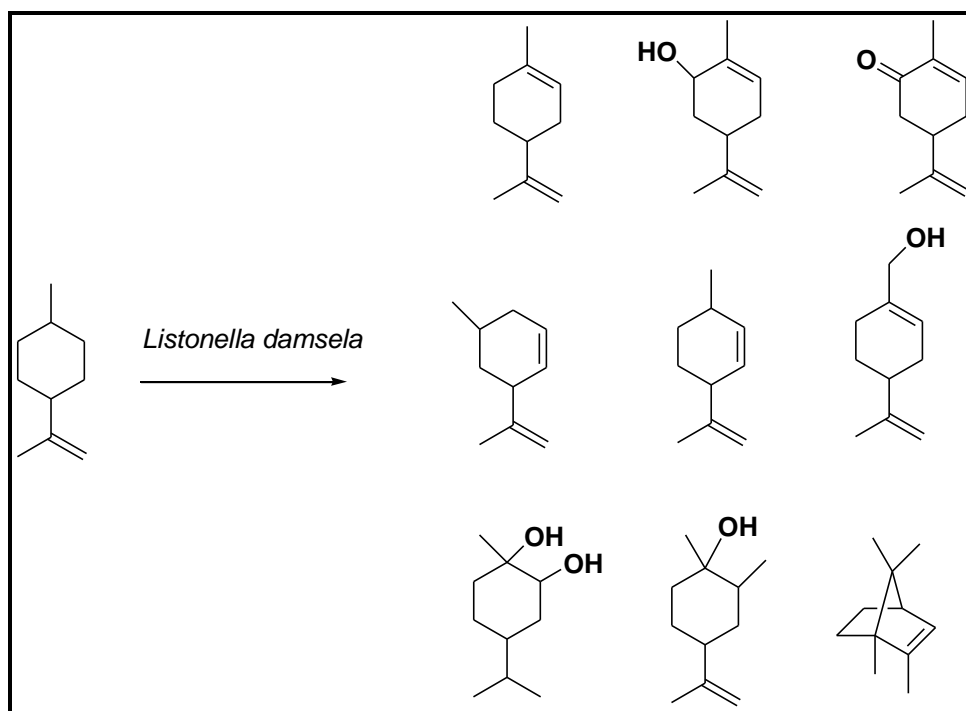


Tabela 2- Excesso enantiomérico e conversão na redução de α -ceto éster

	1a		2a	
	<i>e.e.</i> %	<i>c</i> %	<i>e.e.</i> %	<i>c</i> %
<i>Pseudonocardia thermophila</i>	> 99	74	98	81
<i>Saccharomonospora yiridis</i>	90	51	84	77
<i>Stereptomycetos thermovulgaris</i>	89	44	87	66

Houjin *et al.* (2006) utilizaram cepas de bactérias marinhas na biotransformação do limoneno. Ao se utilizar como biocatalisador a bactéria *Listonella damsela*, foram obtidos os produtos de biotransformação apresentado na Figura 19, todos os produtos apresentaram porcentagem maior que 1%.

Figura 19-Produto de biotransformação do limoneno



2.6 Isolamento de micro-organismos

Micro-organismos são predominantemente fontes de novas enzimas, enquanto que organismos animal e vegetal contribuem menos que 10% cada. Os micro-organismos podem ser obtidos através de triagem “*screening*”, sendo essa a principal maneira para o descobrimento de novas atividades enzimáticas (BOMMARIUS; RIEBEL, 2004).

Os micro-organismos têm sua relevância devido ao curto período de geração e a grande diversidade, levando a possibilidades ilimitadas quanto ao uso como biocatalisadores, bem como quanto à quantidade de enzimas envolvidas. A busca por novas enzimas e micro-organismos adequados para biotransformações tem recebido uma grande atenção. Estimativas indicam que menos do que 1% da diversidade microbiana foi cultivado em laboratório (RODRIGUEZ *et al.*, 2011; CARVALHO *et al.*, 2005).

O isolamento de micro-organismo é importante, uma vez que origina uma cultura para estudos laboratoriais experimentais e para aplicações na biocatálise (OGAWA; SHIMIZU, 1999).

Para o isolamento de micro-organismos faz-se necessário à separação de diferentes organismos a partir da comunidade microbiana. Um dos procedimentos conhecidos é denominado como cultura de enriquecimento. É uma metodologia de isolamento para os micro-organismos que apresentam uma especial característica de crescimento. Nesse tipo de cultura são escolhidos um meio e um conjunto de condições de incubação que sejam seletivos para o organismo desejado e não seletivo para os organismos indesejados. Outra técnica é a aclimatação ou isolamento induzido que é aplicada quando um composto tóxico ou não natural é utilizado como substrato. Normalmente tal técnica é executada a longo prazo para isolar um micro-organismo que não é facilmente isolado por cultura de enriquecimento. Neste caso, é possível isolar o micro-organismo que é adaptável ao meio sintético utilizado. (MADIGAN *et al.*, 2010; ASANO, 2002).

O isolamento enriquecido é mencionado em um trabalho desenvolvido por Soltz *et al.*, 1998, na utilização de nitrilas aromáticas para isolamento de bactérias advindas de solo, resultando em bactérias com atividade nitrilase.

Araújo *et al.* (2011) utilizaram bactérias isoladas de solo e sedimentos da Antártida através da técnica de isolamento induzido na presença de (*R,S*) 1-feniletanol, como fonte de carbono. Foram isolados 232 micro-organismos, onde 15 micro-organismos apresentaram álcool desidrogenase que catalisaram reações enantiosseletiva de oxidação produzindo o álcool *S*.

Os micro-organismos que vivem no interior das plantas são conhecidos como endofíticos. Esse termo é utilizado para designar o ambiente onde o micro-organismo foi encontrado, pois o próprio nome *endo* (interior) *fito* (planta) refere-se a micro-organismos isolados do interior da planta. Esses micro-organismos podem conviver mutualisticamente (sem causar aparente dano ao hospedeiro) ou serem fitopatogênicos. Podem ser encontrados nas partes áreas dos vegetais, bem como nas raízes que são uma das principais portas de entrada para tais micro-organismos (SAIKKONEN *et al.*, 2004).

A eficiência de micro-organismos endofíticos como biocatalisadores se deve a sua coevolução genética e recombinação genética com a planta hospedeira. Diante disso pode ser destacado que a relação simbiótica com planta leva esses micro-organismos a lidar com vários compostos que muitas vezes podem ser tóxicos. Com todos esses precedentes espera-se que

os micro-organismos endofíticos isolados desenvolvam “aclimatação” com uma série de moléculas, para viver simbioticamente com a planta (RODRIGUEZ *et al.*, 2011).

A incidência de micro-organismos endofíticos em Cactaceas é relatada na literatura, em um projeto desenvolvido pela Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). Neste trabalho relatou-se o isolamento de micro-organismos advindos da Cactacea *Opuntia ficus-indica* com o isolamento de 180 bactérias e 100 fungos (Melo *et al.*, 2001).

A grande biodiversidade de micro-organismos favorece um amplo reservatório de biocatalisadores a serem descobertos através do isolamento enriquecido ou induzido, para a aplicação em processos biocatalíticos.

Capítulo 3

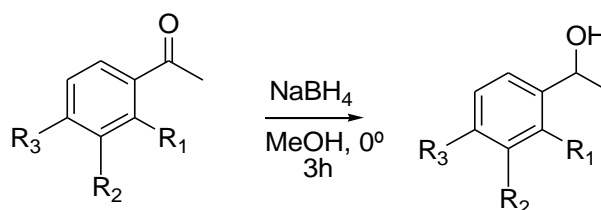
Resultados Discussão

3.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Preparação dos álcoois padrões

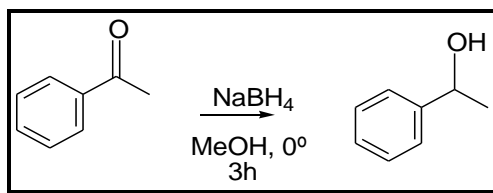
Inicialmente, foram preparados os álcoois racêmicos (**1b-16b**), Figura 20, obtidos pela redução química das cetonas pró-quirais correspondentes com boro-hidreto de sódio (Figura 21). Os álcoois racêmicos (**1b-16b**) foram considerados padrões para posterior comparação com os álcoois obtidos por biorreduções utilizando o micro-organismo I-2. Os rendimentos estão apresentados na Tabela 3, variando de moderados a bons (60-90%).

Figura 20-Álcoois padrões racêmicos, utilizados como padrões nas análises por cromatografia líquida de alta eficiência-CLAE



1a) R ₁ =H; R ₂ = H; R ₃ = H	1b) R ₁ =H; R ₂ = H; R ₃ = H
2a) R ₁ =H; R ₂ = H; R ₃ = OCH ₃	2b) R ₁ =H; R ₂ = H; R ₃ = OCH ₃
3a) R ₁ =H; R ₂ = H; R ₃ = CH ₃	3b) R ₁ =H; R ₂ = H; R ₃ = CH ₃
4a) R ₁ =H R ₂ = H; R ₃ = NO ₂	4b) R ₁ =H R ₂ = H; R ₃ = NO ₂
5a) R ₁ =H; R ₂ = H; R ₃ = Br	5b) R ₁ =H; R ₂ = H; R ₃ = Br
6a) R ₁ =H; R ₂ = H; R ₃ = Cl	6b) R ₁ =H; R ₂ = H; R ₃ = Cl
7a) R ₁ =H; R ₂ = H; R ₃ =F	7b) R ₁ =H; R ₂ = H; R ₃ =F
8a) R ₁ =H; R ₂ = OCH ₃ ; R ₃ = H	8b) R ₁ =H; R ₂ = OCH ₃ ; R ₃ = H
9a) R ₁ =H; R ₂ = CH ₃ ; R ₃ = H	9b) R ₁ =H; R ₂ = CH ₃ ; R ₃ = H
10a) R ₁ =H; R ₂ = NO ₂ ; R ₃ = H	10b) R ₁ =H; R ₂ = NO ₂ ; R ₃ = H
11a) R ₁ =OCH ₃ ; R ₂ = H; R ₃ = H	11b) R ₁ =OCH ₃ ; R ₂ = H; R ₃ = H
12a) R ₁ =CH ₃ ; R ₂ = H; R ₃ = H	12b) R ₁ =CH ₃ ; R ₂ = H; R ₃ = H
13a) R ₁ =NO ₂ ; R ₂ = H; R ₃ =H	13b) R ₁ =NO ₂ ; R ₂ = H; R ₃ =H
14a) R ₁ =Br; R ₂ = H; R ₃ =H	14b) R ₁ =Br; R ₂ = H; R ₃ =H
15a) R ₁ =Cl; R ₂ = H; R ₃ = H	15b) R ₁ =Cl; R ₂ = H; R ₃ = H
16a) R ₁ =F; R ₂ = H; R ₃ = H	16b) R ₁ =F; R ₂ = H; R ₃ = H

Figura 21- Reação de redução da acetofenona e derivados utilizando boro-hidreto de sódio



Os álcoois racêmicos padrões foram preparados e analisados por Ressonância Magnética Nuclear -RMN ^1H . Os espectros estão anexados no final desta dissertação.

Tabela 3- Rendimentos dos álcoois racêmicos 1b-16b

ÁLCOOIS PADRÕES	Rendimento (%)
(±)-1-Feniletanol (1b)	60
(±)-1-(4-metóxfenil)-etanol (2b)	85
(±)-1-(4-metilfenil)-etanol (3b)	60
(±)-1-(4-nitrofenil)-etanol (4b)	80
(±)-1-(4-bromofenil)-etanol (5b)	75
(±)-1-(4-clorofenil)-etanol (6b)	90
(±)-1-(4-fluorofenil)-etanol (7b)	70
(±)-1-(3-metóxfenil)-etanol (8b)	86
(±)-1-(3-metilfenil)-etanol (9b)	60
(±)-1-(3-nitrofenil)-etanol (10b)	90
(±)-1-(2-metóxfenil)-etanol (11b)	80
(±)-1-(2-metilfenil)-etanol (12b)	74
(±)-1-(2-nitrofenil)-etanol (13b)	80
(±)-1-(2-bromofenil)-etanol (14b)	72
(±)-1-(2-clorofenil)-etanol (15b)	75
(±)-1-(2-fluorofenil)-etanol (16b)	75

3.2 Coleta da planta

Foram coletadas 25 g de cladódio da cactácea *N. cochenellífera*, conforme procedimento experimental relatado no item 6.1 (p.74).

3.3 Isolamento induzido e triagem dos micro-organismos

O isolamento dos micro-organismos foi feito de forma induzida com a adição do substrato orgânico acetofenona, ao meio de cultura batata dextrose ágar (BDA) e ao extrato do vegetal da Cactacea *N. cochenllífera*.. Esta técnica facilita a adaptação do micro-organismo ao meio reacional com substrato, durante o processo de crescimento. Com esta técnica foram isolados quatro micro-organismos codificados como I-1, I-2, I-3, I-4, sendo analisados em microscópio apenas para determinar a pureza das colônias para em seguida serem cultivados.

O potencial biocatalítico dos quatro micro-organismos foi avaliado utilizando-os como biocatalisadores na reação de biorredução da acetofenona (**1a**) em meio reacional de células em crescimento, durante o período de 8 dias. Analisou-se a produção de 1-feniletanol quanto à conversão (*c*) e excesso enantiomérico (*e.e.*). Nessa etapa, apenas o micro-organismo (I-2) mostrou-se eficaz em relação ao excesso enantiomérico e conversão. Os outros micro-organismos levaram a valores de excessos enantioméricos e conversões não satisfatórios. Deve ser destacado que o micro-organismo I-4 levou a um bom excesso enantiomérico, no entanto com baixa conversão (Tabela 4).

Tabela 4- Resultados da biorredução utilizando micro-organismos isolados da *Nopalea Cochenellífera* (L.) Salm Dyck, com tempo de reação de 8 dias

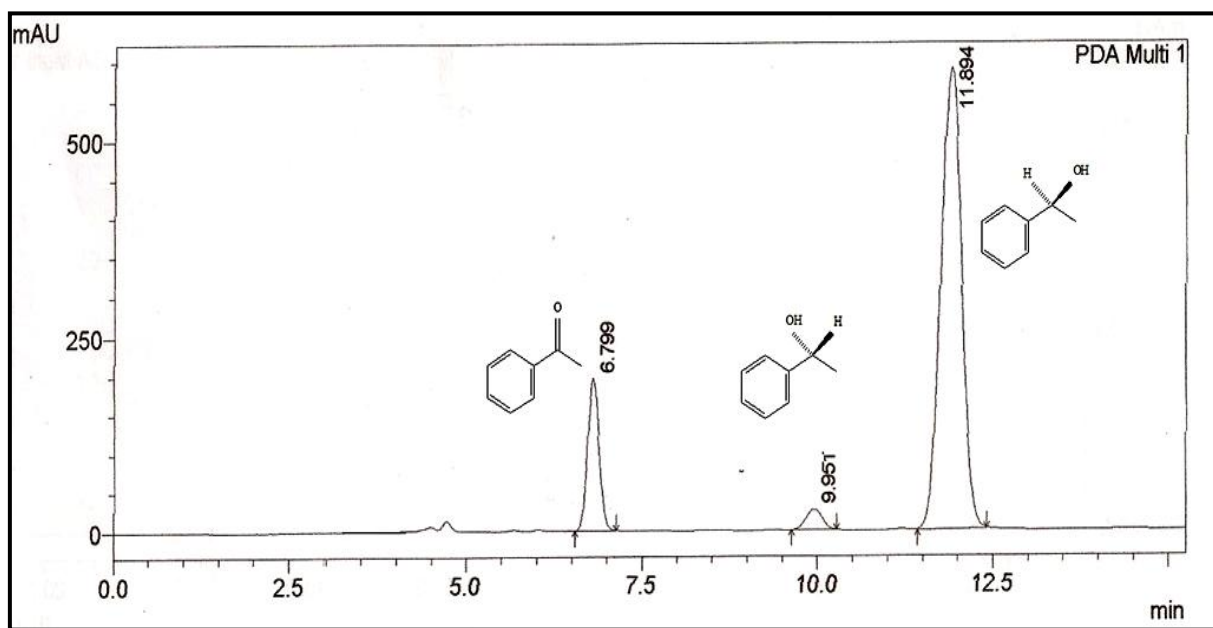
Micro-organismos isolados	<i>e.e.</i> %	<i>c</i> %
I-1	28	21
I-2	93	74
I-3	31	17
I-4	88	24

A identificação do micro-organismo I-2 foi realizada pelo Departamento de Microbiologia da Universidade Federal do Ceará, pelo grupo de pesquisadores sob

coordenação da Prof^a. Dra. Vânia Maria Maciel Melo, através do sequenciamento do nucleotídeo. A análise foi realizada usando a base de dados público *National Center For Biotechnology Information- NCBI*, *www.ncbi.nlm.nih.gov*. O micro-organismo I-2 com melhor atividade foi identificado como uma bactéria do gênero *Pseudomonas* sp que por comparação com a base de dados do *NCBI*, é compatível com bactéria advinda da rizosfera, porém no texto desta dissertação continuará sendo citada como I-2.

A Figura 22 apresenta o cromatograma obtido da análise do produto de biorredução da acetofenona (**1a**) com o micro-organismo I-2. Como pode ser observado no cromatograma, o micro-organismo I-2 levou a um excesso enantiomérico de 93% com álcool de configuração (*S*). A configuração foi determinada pela rotação óptica específica $[\alpha]_D^{20} = -35,0$ (c 0,8; CHCl₃), *e.e.* 93% e comparada com a literatura $[\alpha]_D^{20} = -47,0$ (c 1,1; CHCl₃) *e.e.* 97% (VIERA *et al.*; 2010).

Figura 22-Cromatograma da mistura reacional obtida da biorredução da acetofenona (1a) utilizando o micro-organismo I-2 com tempo de reação de 8 dias



3.3 Otimização dos processos biocatalíticos utilizando micro-organismo I-2.

Diante do bom potencial biocatalítico do micro-organismo I-2 na biorredução do substrato padrão acetofenona (**1a**), foi realizado a otimização do processo bioacatalítico, visando obter bons excessos enantioméricos e conversão, variando o meio reacional, pH e

temperatura. Os resultados obtidos encontram-se apresentados e discutidos nos itens seguintes.

3.3.1 Otimização dos meios reacionais

As reações de biorredução foram realizadas de três formas: com células íntegras do micro-organismo em crescimento, células em repouso e células imobilizadas. A primeira oferece a possibilidade de uma alta atividade catalítica, a segunda oferece a possibilidade da obtenção do produto com elevada pureza e baixa probabilidade de formação de subprodutos e a terceira tem a capacidade de reutilizar o biocatalisador em outro ciclo reacional (FABER, 2000).

3.3.1.1 Células em crescimento

Para células em crescimento, de acordo com procedimento descrito no item 6.5.2.1 (p. 76), as reações foram acompanhadas por períodos de 2, 4, 6 e 8 dias.

Os melhores resultados foram obtidos em 8 dias, com o excesso enantiomérico de 93% e conversão de 74%, como apresentado no Gráfico 1. A Figura 23 apresenta o cromatograma referente à biorredução da acetofenona (**1a**), utilizando células em crescimento com biomassa de 1,5 g com dois dias de reação e mantendo-se constante a partir do quarto dia reacional com 2,4 g de biomassa. Através da análise do Gráfico 1 observa-se que já nos primeiros dias de reação foram obtidos resultados bastante satisfatórios de enantiosseletividade (82%). Diferentemente, Andrade et al. (2005), realizaram a biorredução com acetofenona utilizando cepas de *Pseudomonas* sp, porém mesmo com o longo tempo reacional, o substrato foi recuperado inalterado.

Gráfico 1- Perfil de excesso enantiomérico e conversão da biorredução da acetofenona (1a) utilizando células em crescimento de I-2

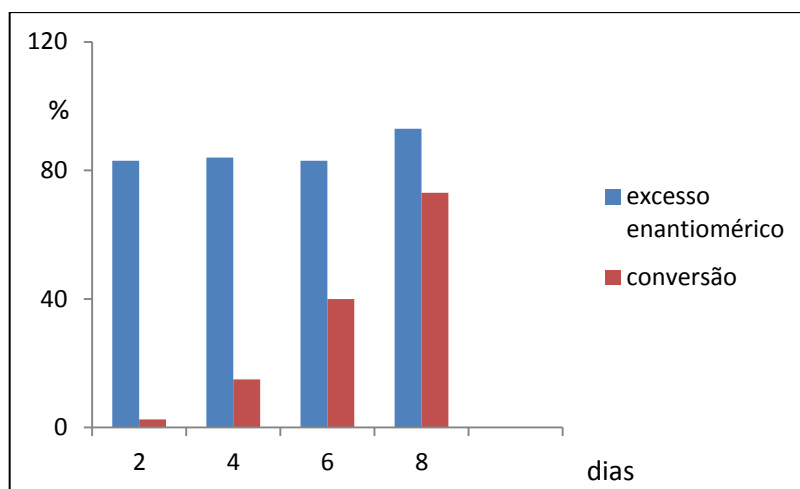
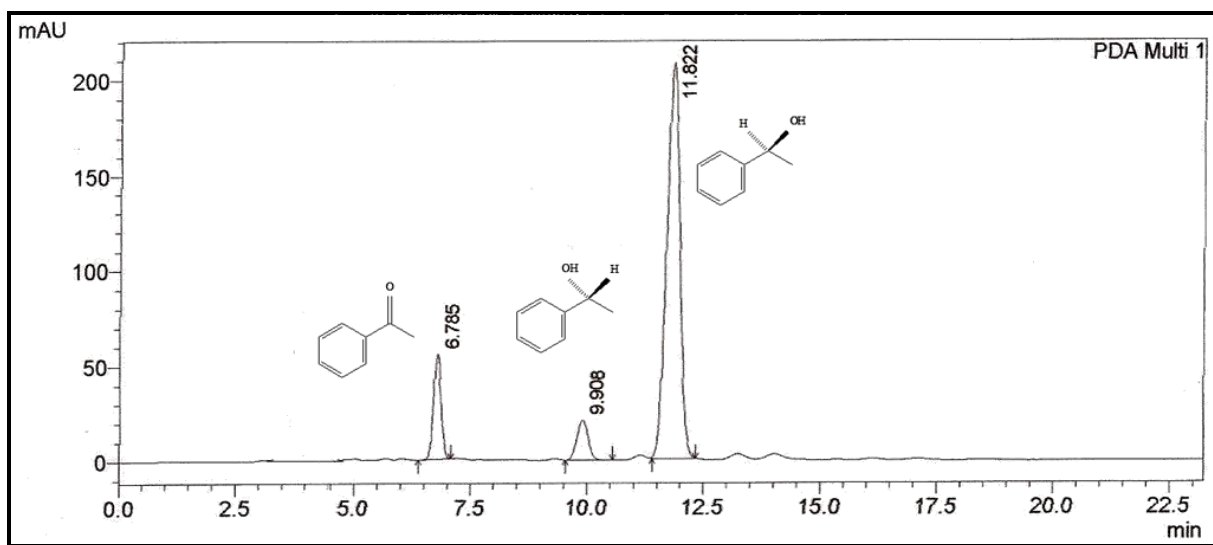


Figura 23-Cromatograma da biorredução da acetofenona (1a) utilizando células em crescimento de I-2



3.3.1.2 Células em repouso

Sabendo-se que o uso de células em repouso diminui a probabilidade da formação de subprodutos, realizou-se a biorredução da acetofenona com células em repouso de I-2, em tampão fosfato, de acordo com o procedimento descrito no item 6.5.2.2 (p.76). As reações foram monitoradas nos intervalos de 2, 4, 6 e 8 dias. Foi avaliado o efeito da variação de quantidade de biomassa de 1 g para 2 g.

Observou-se que no quarto dia de reação já se obtinha resultados semelhantes aos adquiridos com células em crescimento, em tempo reacional de oito dias. Portanto, com uma diminuição da metade do tempo reacional, Gráficos 2 e 3.

As células em repouso, frequentemente, são mais eficientes em relação às células íntegras em crescimento, pois ocorre uma facilidade de interação entre substrato /enzima/produto. Yan e colaboradores (2011) utilizaram células em repouso e células em crescimento do micro-organismo *E.colli* SCR1 para redução de algumas cetonas, sendo que os melhores resultados ocorreram em sistema de células em repouso, enquanto que em sistema de células em crescimento algumas cetonas não reagiram.

Ao realizarmos as reações de biorredução com células em repouso de I-2, verificamos que não ocorreram mudanças significativas no processo reacional, com 1 g ou 2 g de biomassa, em relação ao excesso enantiomérico e conversão, Gráfico 2 e 3. Quando utilizou-se 1 g ou 2 g de biomassa observou-se que com 4 dias o excesso enantiomérico foi de 89%. Quando se utilizou 1 g de biomassa a conversão foi de 82% (4 dias de reação) e com 2 g a conversão apresentou um leve decréscimo para 77%. As Figuras 24 e 25 apresentam os cromatogramas referentes à biorredução da acetofenona (**1a**) com 1 g e 2 g de biomassa, com células em repouso de I-2 respectivamente.

Gráfico 2- Perfil do excesso enantiomérico e conversão da biorredução da acetofenona(1a) utilizando 1 g de biomassa de células em repouso de I-2

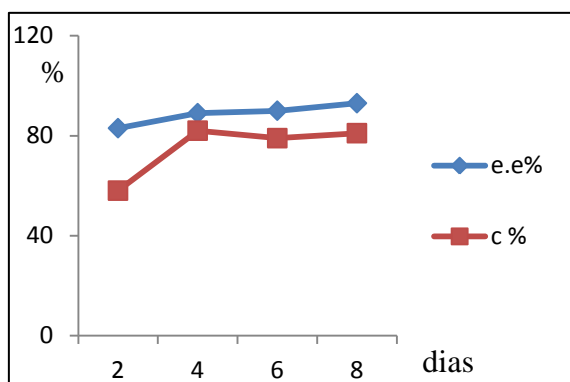


Gráfico 3- Perfil do excesso enantiomérico e conversão da biorredução da acetofenona(1a) utilizando 2 g de biomassa de células em repouso de I-2

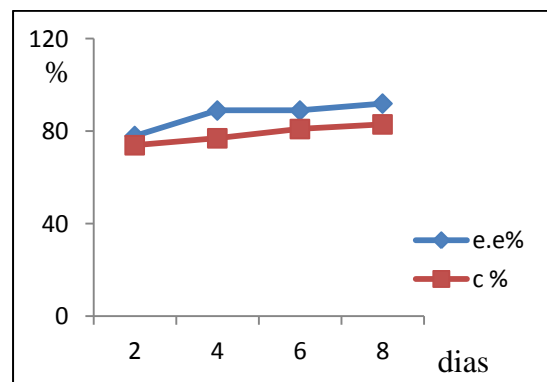


Figura 24- Cromatograma da biorredução da acetofenona (1a) utilizando 1g de biomassa em sistemas de células em repouso

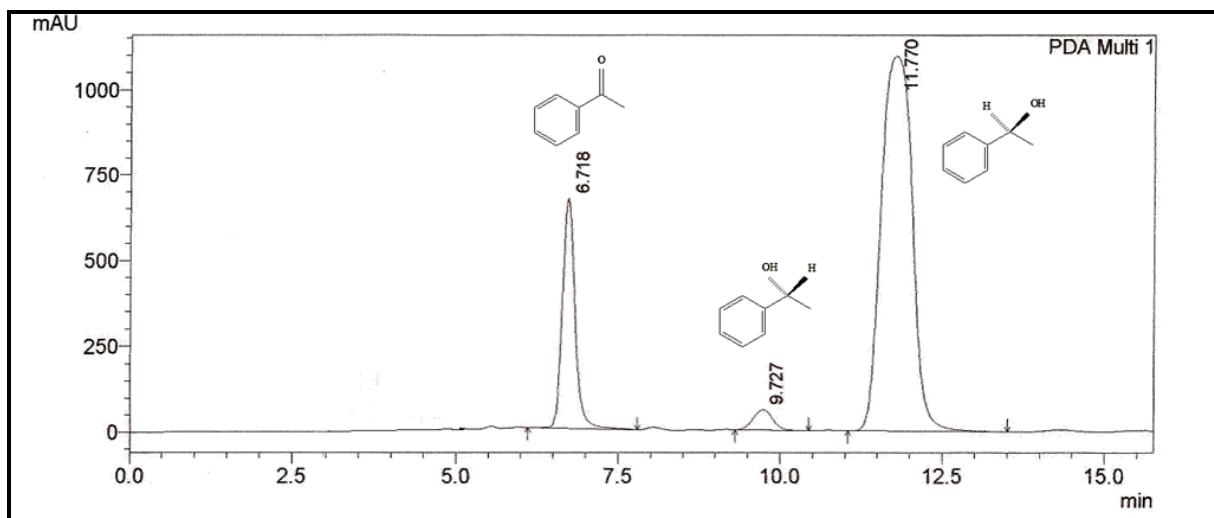
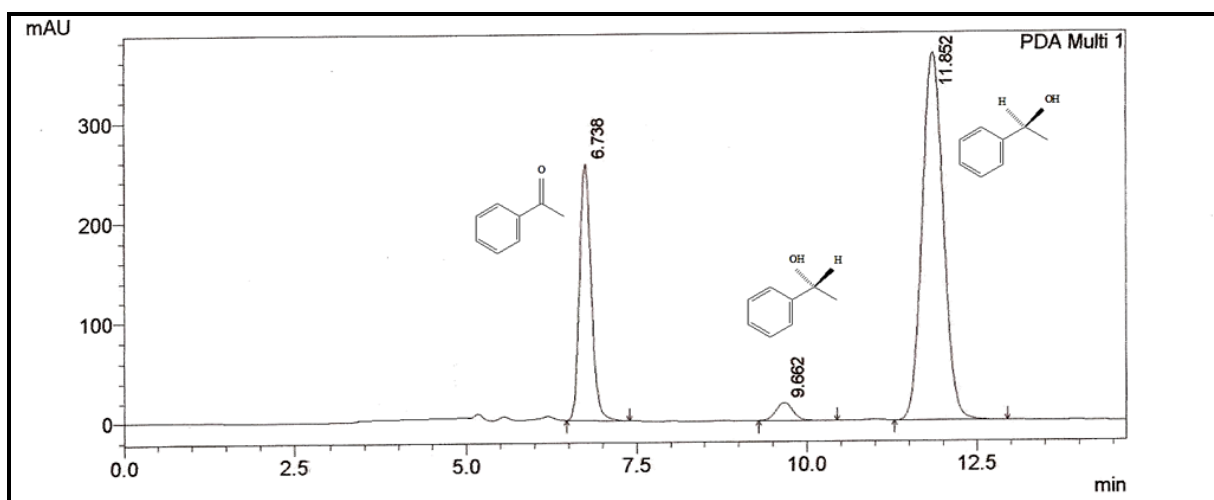


Figura 25- Cromatograma da biorredução da acetofenona (1a) utilizando 2g de biomassa em sistema de células em repouso



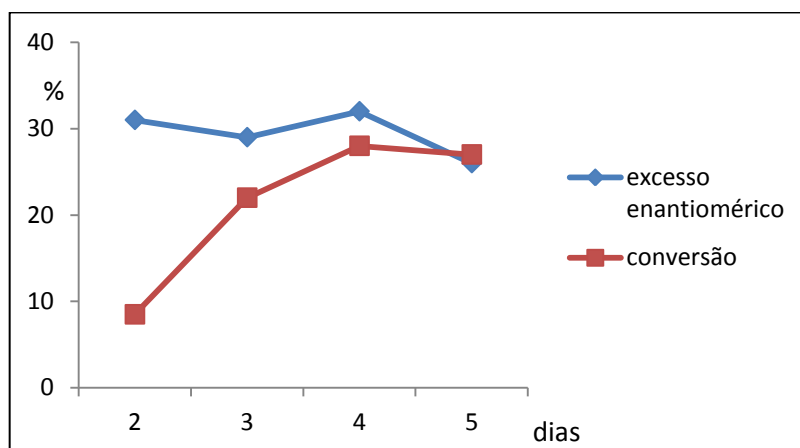
3.3.1.3 Células imobilizadas

Na busca de aperfeiçoar o processo biocatalítico, realizaram-se reações de biorredução utilizando células imobilizadas em alginato de cálcio, de acordo com o procedimento descrito no item 6.5.2.3 (p. 76). A escolha deste processo foi feita devido a algumas vantagens, como: a facilidade de separação das esferas do meio reacional, obtenção de um biocatalisador com atividade e estabilidade que não sejam afetadas durante o processo

reacional e reutilização em experimentos subsequentes (DALLA-VECCHIA, NASCIMENTO, SOLDI, 2004).

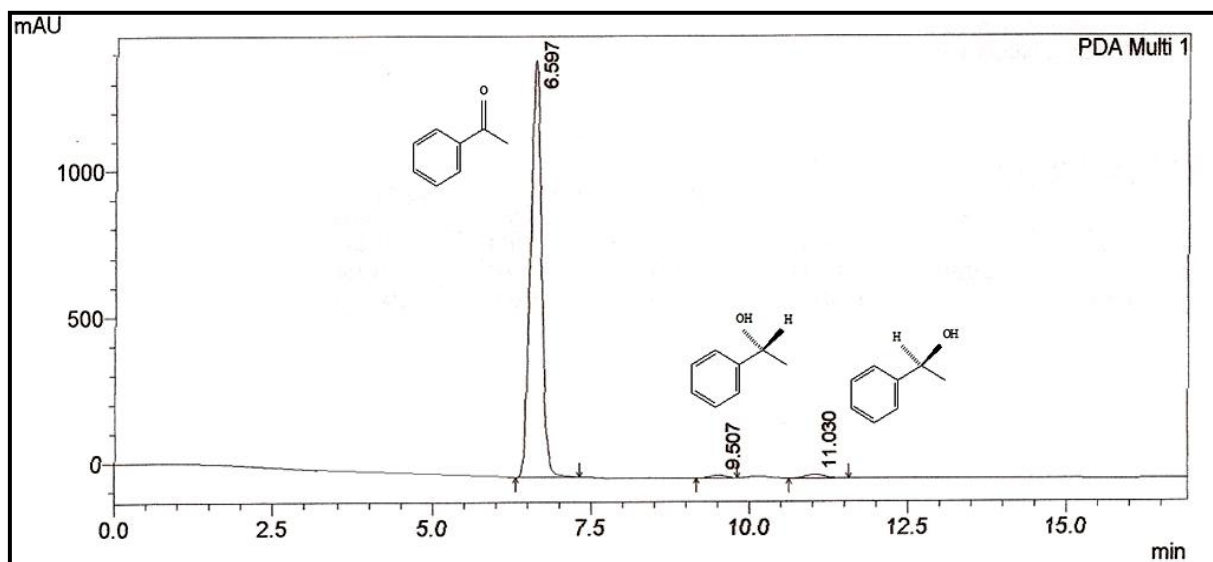
Para esta etapa, as reações foram analisadas no intervalo de 2, 3, 4 e 5 dias, utilizando 1 grama de biomassa. Observou-se uma queda significativa tanto no excesso enantiomérico como na conversão, como pode ser observado no Gráfico 4. A Figura 26 apresenta o cromatograma da biorredução utilizando células imobilizadas.

Gráfico 4- Perfil do excesso enantiomérico e conversão da biorredução da acetofenona utilizando células imobilizadas em alginato de sódio.



Diante de tais resultados é possível concluir que o alginato de cálcio não é o suporte adequado para a imobilização do micro-organismo I-2. Segundo Dalla-Vecchia, Nascimento e Soldi (2004), a imobilização pode inibir ou aumentar a atividade e estabilidade enzimática, mas não existe uma regra que prediga a manutenção de tais fatores.

Figura 26-Cromatograma da biorredução da acetofenona (1a) utilizando células imobilizadas



3.3.2 pH do meio reacional

Nesse estudo utilizou-se 1 g de I-2 na forma de células em repouso, tempo reacional de quatro dias e temperatura de 28 °C, na biorredução da acetofenona (**1a**), variando o pH do meio reacional (6, 7, 8). Os resultados encontram-se sumariados no Gráfico 5.

Observa-se que em pH 6 (ácido) houve decréscimo tanto do excesso enantiomérico, quanto da conversão. Em pH 8 (básico) o excesso enantiomérico não teve um decréscimo tão significativo, porém a conversão diminuiu drasticamente. Em pH 7 (neutro) foram obtidos os melhores valores de excesso enantiomérico e conversão. As Figuras 27-29 apresentam os cromatogramas com diferentes valores de pH.

Dessa forma foi possível verificar que o pH ideal para realização da biorredução da acetofenona na presença de I-2 é o neutro (pH 7), os resultados são condizentes com o fato das enzimas possuírem um pH ótimo de atuação, algumas catalisam reações com pH neutros outras em meio ácido como a pepsina. No caso em estudo, as enzimas produzidas pelo micro-organismo I-2 são sensíveis ao meio ácido e básico. Tal variação é atribuída ao fato de que o sítio ativo da enzima contém grupos de aminoácidos ionizáveis, influenciáveis com a variação do pH podendo levar a modificação da conformação da enzima com consequente diminuição da atividade e seletividade enzimática (BIANCONI, 2006).

Gráfico 5- Perfil do excesso enantiomérico e conversão utilizando solução tampão com diferentes valores de pH

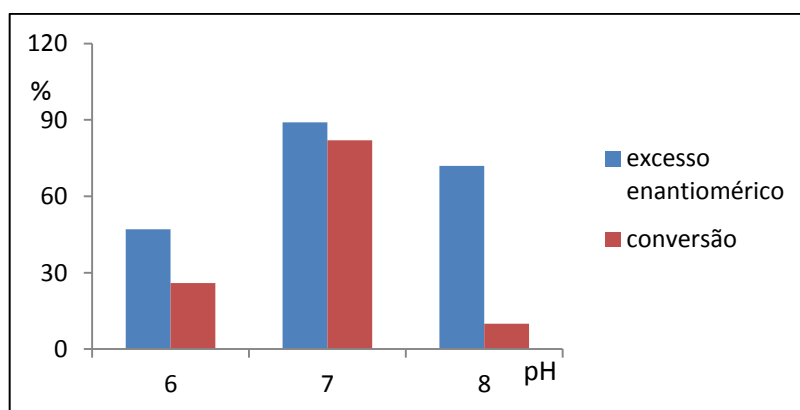


Figura 27-Cromatograma da biorredução da acetofenona (1a) em pH 6

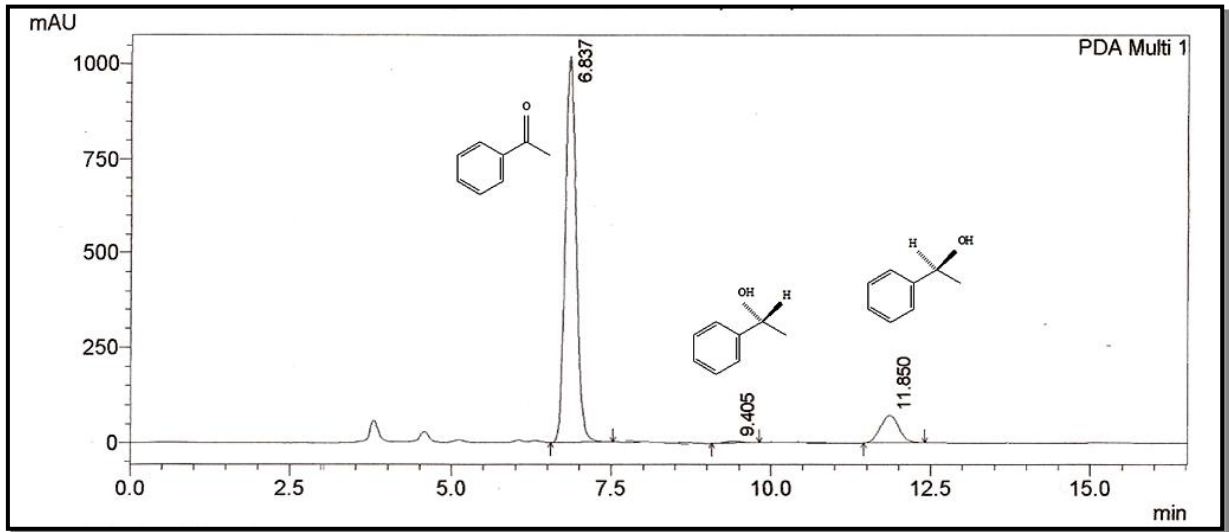


Figura 28-Cromatograma da biorredução da acetofenona (1a) em pH 7

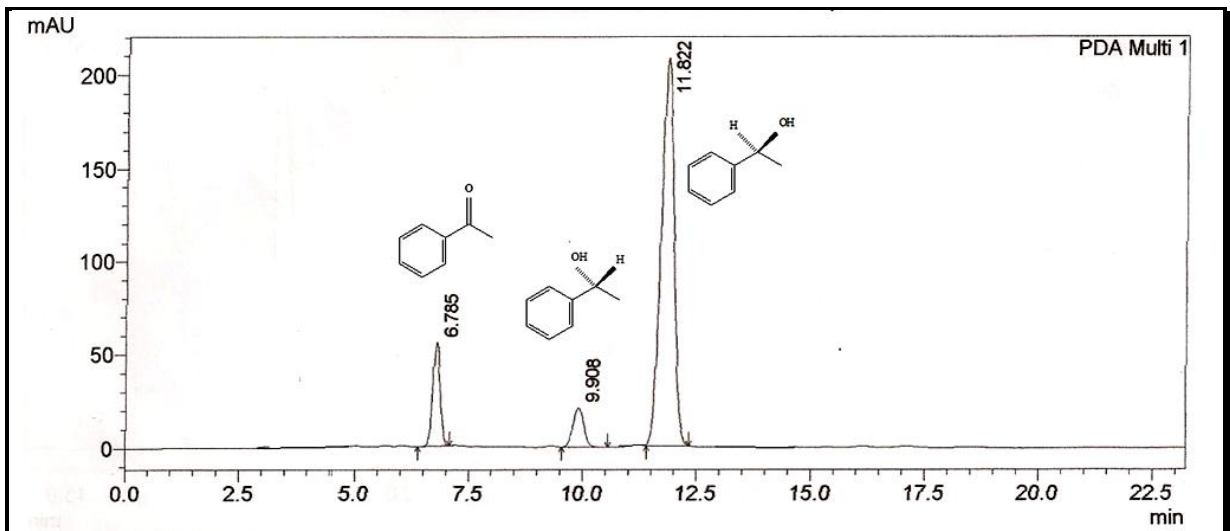
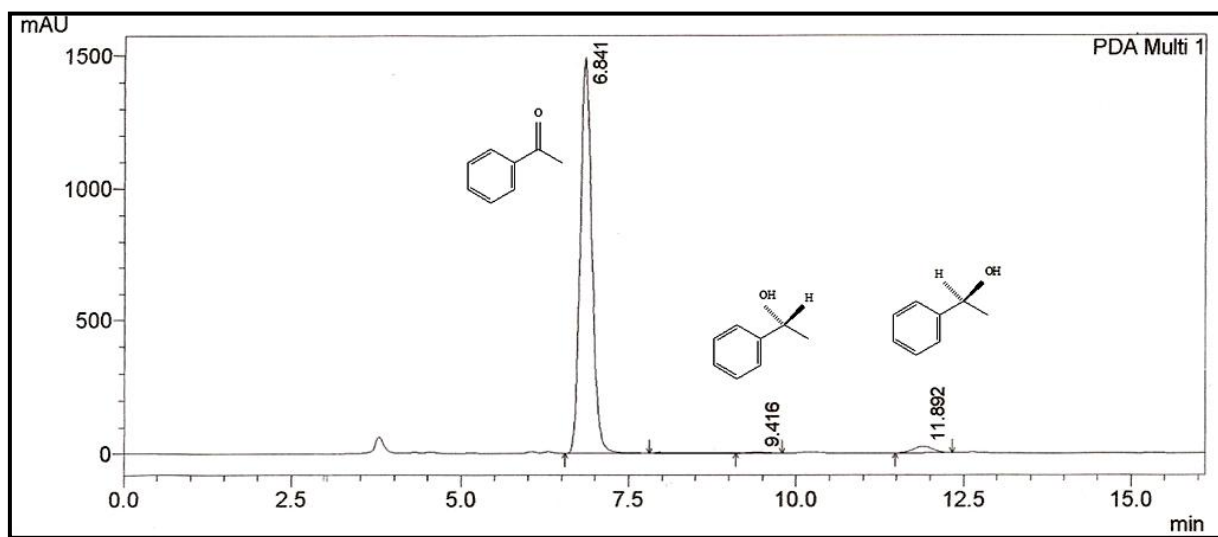


Figura 29-Cromatograma da biorredução da acetofenona (1a) em pH 8

3.3.3 Temperatura

Nessa etapa foram avaliados três valores de temperatura: 23, 28 e 33 °C. As biorreduções foram realizadas na presença de 1g de células em repouso I-2, em meio tamponante com pH 7 (neutro) e tempo reacional de quatro dias, utilizando acetofenona (**1a**) como substrato modelo. De acordo com o Gráfico 6, nas temperaturas de 23 °C e 33 °C ocorre um decréscimo significativo na conversão quando comparado a reação realizada a 28 °C e o excesso enantiomérico tem variação mínima.

Os resultados refletem o efeito da temperatura sobre a enzima, em que a atividade é maximizada em uma determinada temperatura e o aumento ou a diminuição dessa temperatura ideal leva um decréscimo da atividade, assim como em uma possível desnaturação da enzima (BIANCONI, 2006). As Figuras 30-32 apresentam os cromatogramas das biorreduções realizadas em diferentes temperaturas.

Gráfico 6- Perfil do excesso enantiomérico e conversão na biorredução da acetofenona utilizando diferentes temperaturas

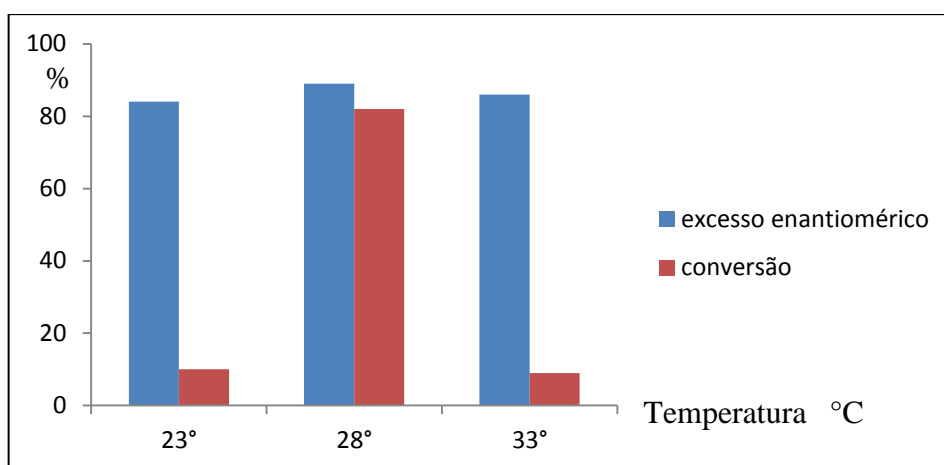


Figura 30-Cromatograma da biorredução da acetofenona (1a) a 23 °C

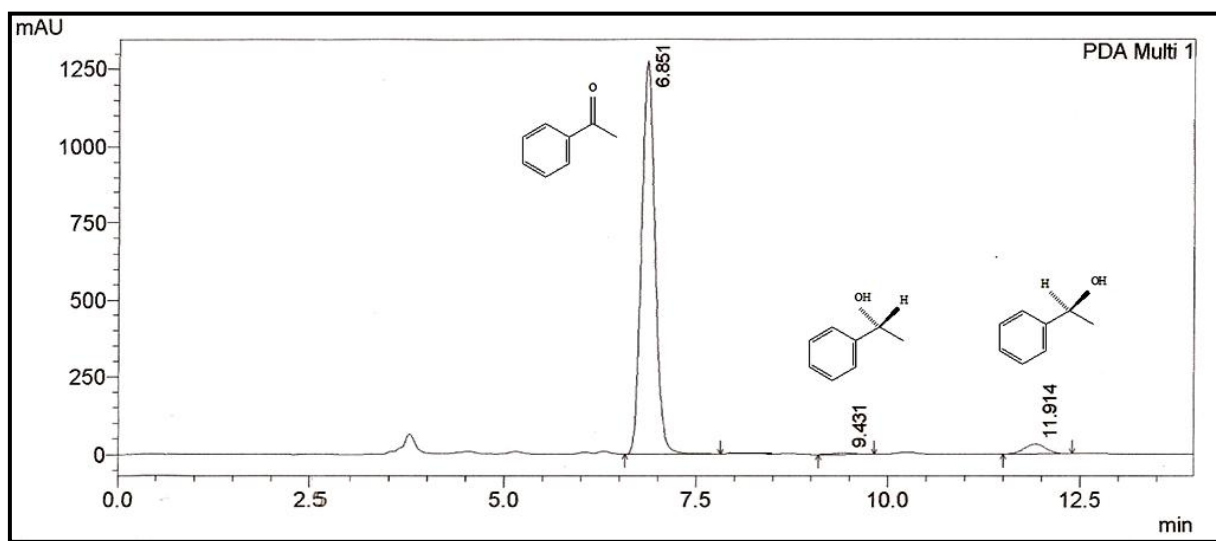


Figura 31-Cromatograma da biorredução da acetofenona (1a) a 28 °C

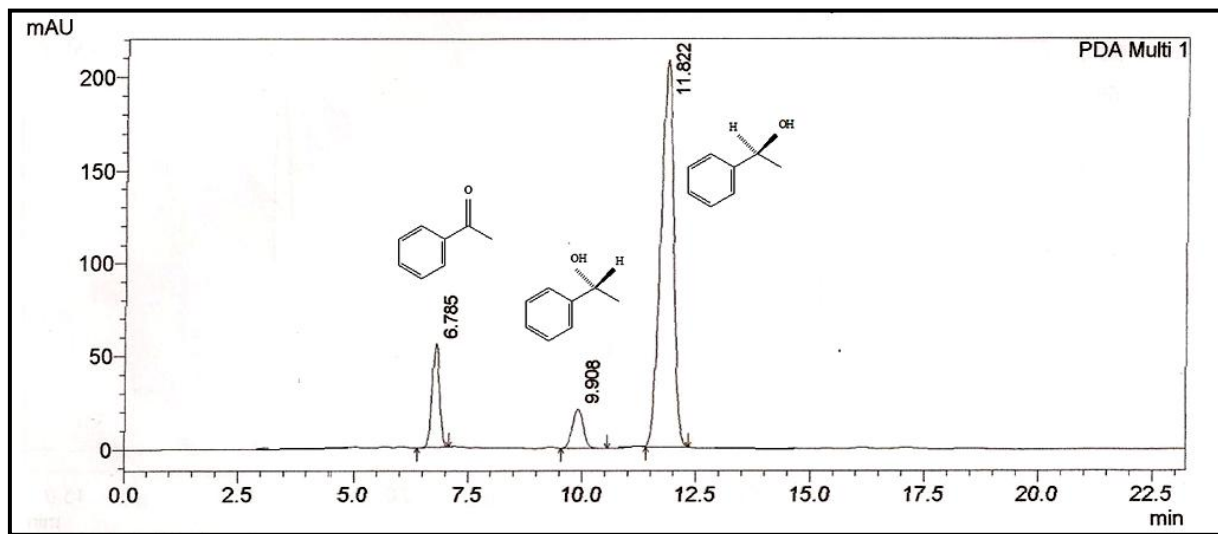
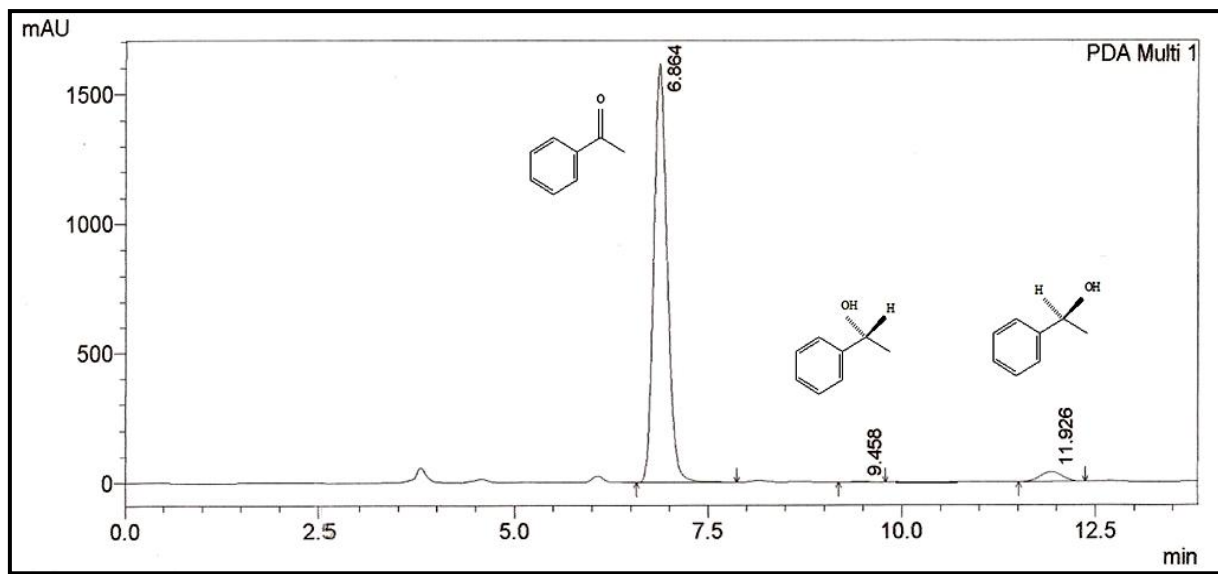


Figura 32-Cromatograma da biorredução da acetofenona (1a) a 33 °C

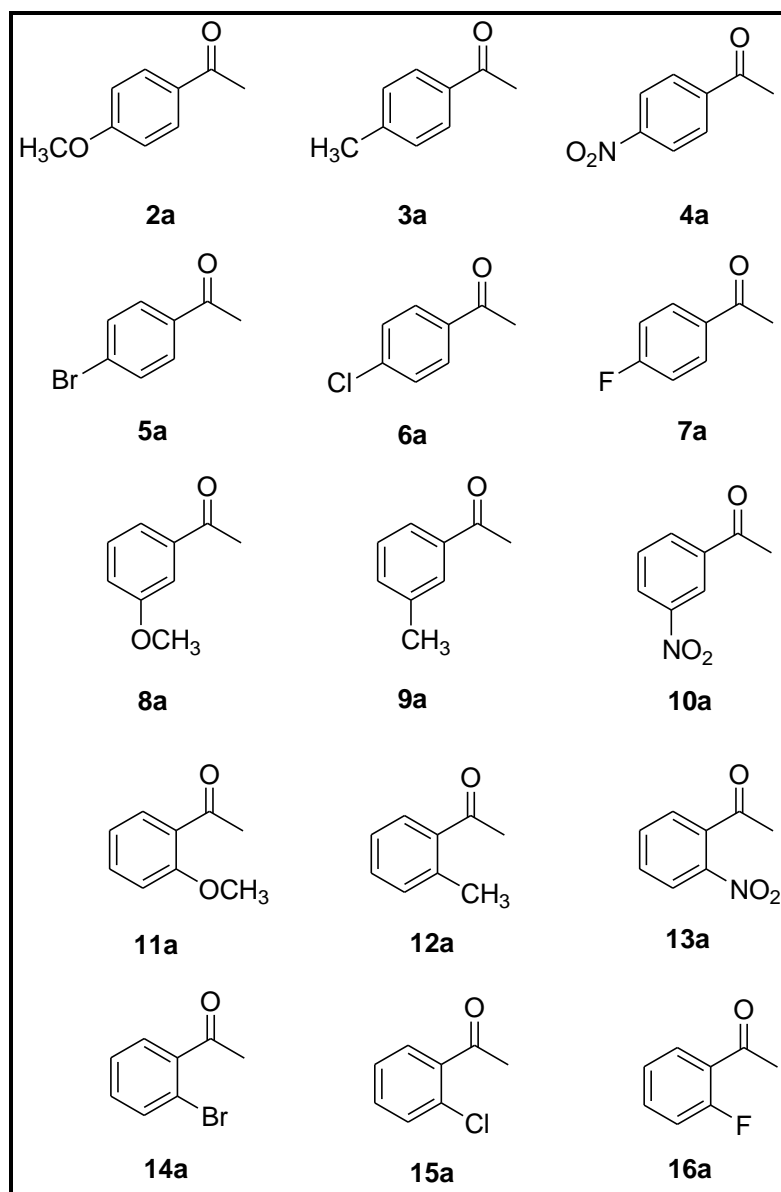


3.4 Reação de biorredução utilizando derivados da acetofenona

Após a otimização do meio reacional (quantidade de biomassa, pH e temperatura), utilizando a acetofenona (**1a**) como substrato padrão, estendeu-se o estudo das reações de biorredução para os seguintes derivados da acetofenona: 4-metóxi-acetofenona (**2a**), 4-metil-acetofenona (**3a**), 4-nitro-acetofenona (**4a**), 4-bromo-acetofenona (**5a**), 4-cloro-acetofenona (**6a**), 4-fluoro-acetofenona (**7a**), 3-metóxi-acetofenona (**8a**), 3-metil-acetofenona (**9a**), 3-nitro-

acetofenona (**10a**), 2-metóxi-acetofenona (**11a**), 2-metil-acetofenona (**12a**), 2-nitro-acetofenona (**13a**), 2-bromo-acetofenona (**14a**), 2-cloro-acetofenona (**15a**), 2-fluoro-acetofenona (**16a**). As estruturas químicas dos substratos encontram-se apresentadas na Figura 33.

Figura 33-Cetonas pró-quirais selecionadas para reação de biorredução com micro-organismo I-2



O estudo da biorredução dos derivados da acetofenona é necessário para avaliar a real capacidade do micro-organismo I-2 para redução de cetonas aromáticas pró-quirais, bem como para verificar a influência do substituinte localizado no anel aromático em relação a seletividade e atividade enzimática.

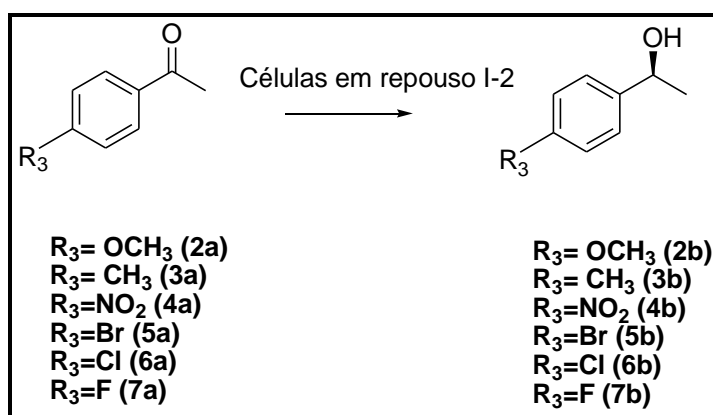
Como o melhor resultado de biorredução da acetofenona foi verificado em meio de células em repouso utilizando 1g de biomassa, em temperatura de 28°C e em pH 7, as biorreduções dos derivados da acetofenona foram realizadas nestas condições pré-estabelecidas.

Os excessos enantioméricos dos produtos foram analisados por CLAE com coluna quiral e o teor de conversão determinado utilizando as respectivas curvas de calibração dos álcoois, que se encontram no item 7.7 (p.79-82).

3.4.1 Cetonas aromáticas *-para* substituídas

Inicialmente, observou-se a influência dos substituintes na posição *-para* nos derivados (2a) 4-metóxi-acetofenona, (3a) 4-metil-acetofenona, (4a) 4-nitro-acetofenona, (5a) 4-bromo-acetofenona, (6a) 4-cloro-acetofenona e (7a) 4-fluoro-acetofenona, frente a biorredução utilizando sistemas de células em repouso do micro-organismo I-2, analisando-se excesso enantiomérico e conversão, dos correspondentes álcoois (Figura 34). Cabe ressaltar que todas as reações de biorredução foram realizadas em duplicata e os valores de excesso enantiomérico e conversões apresentadas nas tabelas correspondem a uma média aritmética. A configuração absoluta do produto majoritário foi determinada por rotação óptica específica e comparada com a literatura (VIEIRA *et al.* 2010; COMASSETO *et al.* 2006; KANTAM *et al.* 2009).

Figura 34- Reação de biorredução utilizando cetonas aromáticas *-para* substituídas



A análise dos resultados apresentados na Tabela 5 revela que os excessos enantioméricos dos álcoois secundários com substituinte na posição *-para*, variam entre

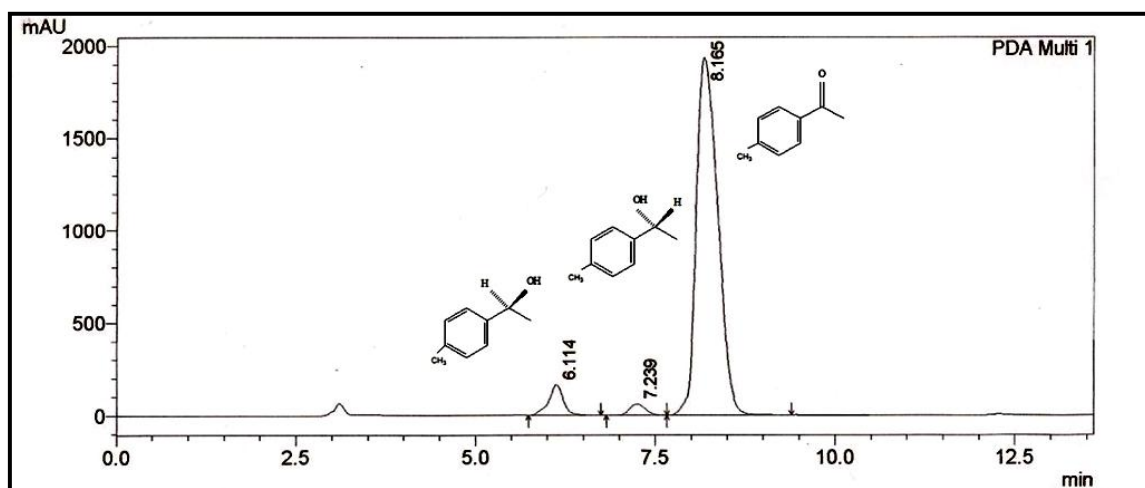
excelente (95%) e moderados (66%) e conversões entre valores baixos (3%) e bons (73%). Cabe ressaltar que os álcoois 2b-7b foram obtidos com configuração *S* (seletividade Prelog).

Tabela 5- Resultados obtidos utilizando micro-organismo I-2 na biorredução de cetonas aromáticas substituídas na posição *-para*

Entrada	Produto	ee %	c %	Configuração
1	1-(4-metóxilfenil)-etanol (2b)	95	3	<i>S</i>
2	1-(4-metilfenil)-etanol (3b)	66	10	<i>S</i>
3	1-(4-nitrofenil)-etanol (4b)	83	6	<i>S</i>
4	1-(4-bromofenil)-etanol (5b)	92	11	<i>S</i>
5	1-(4-clorofenil)-etanol (6b)	93	73	<i>S</i>
6	1-(4-fluorofenil)-etanol (7b)	83	51	<i>S</i>

É possível observar que o grupo metila na posição *-para* leva ao mais baixo valor de seletividade (*ee* 66%), quando comparado com a acetofenona e demais derivados com substituintes na posição *-para*. A Figura 35 apresenta o cromatograma da biorredução com o derivado 3a.

Figura 35- Cromatograma da biorredução do derivado 4-metil-acetofenona (3a) utilizando micro-organismo I-2



Por outro lado, os substituintes halogenados cloro e flúor levam a uma boa seletividade e atividade enzimática quando comparada com os demais substratos com outros

substituintes (entrada 5 e 6, Tabela 5). As Figuras 36 e 37 apresentam os cromatogramas de biorredução com os derivados 6a e 7a.

Figura 36-Cromatograma da biorredução do derivado 4-cloro-acetofenona (6a) utilizando micro-organismo I-2

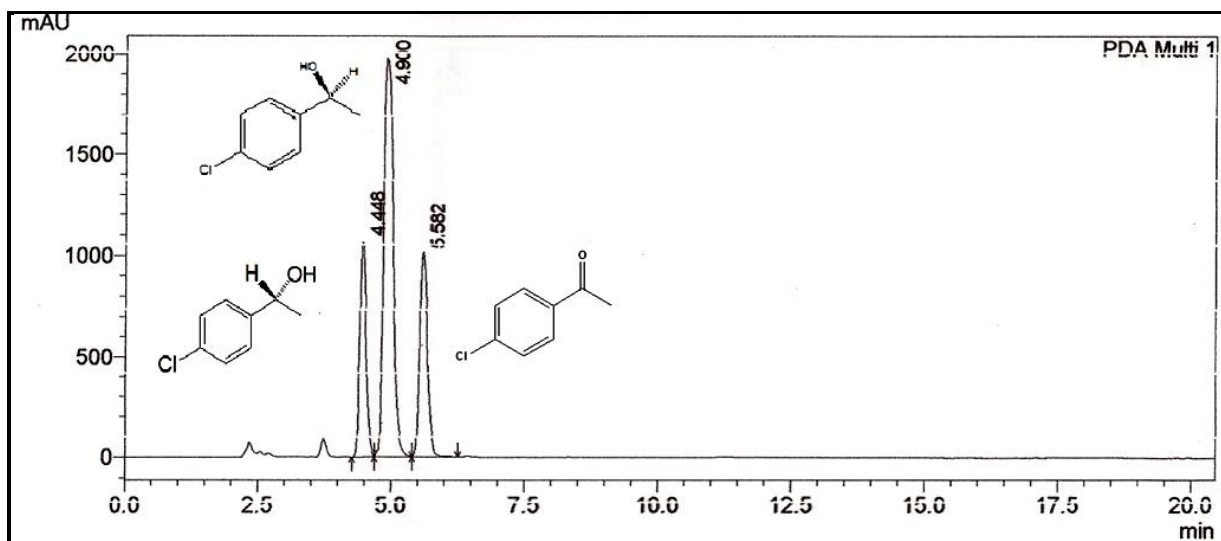
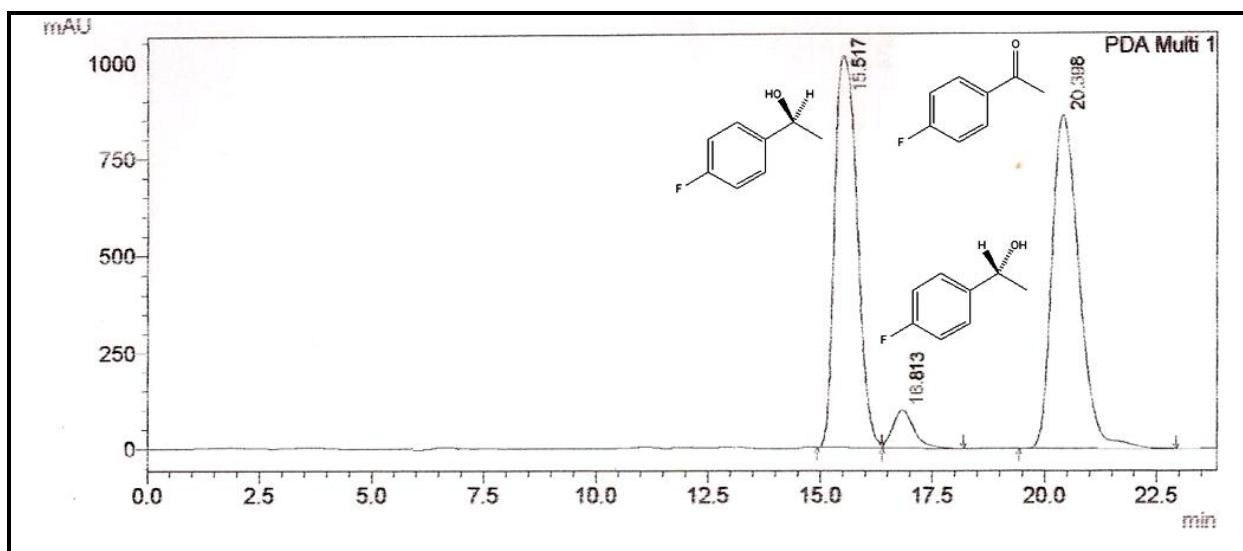


Figura 37- Cromatograma da biorredução do derivado 4-fluoro-acetofenona (6a) utilizando micro-organismo I-2



Com relação aos grupos metoxila, nitro e bromo pode-se observar uma boa seletividade, porém uma baixíssima atividade enzimática (entrada 1, 3 e 4, Tabela 5). As Figuras 38, 39 e 40 apresentam os cromatogramas de biorredução com os derivados 2a, 4a e 5a.

Figura 38-Cromatograma da biorredução do 4-metóxi-acetofenona (2a) utilizando micro-organismo I-2

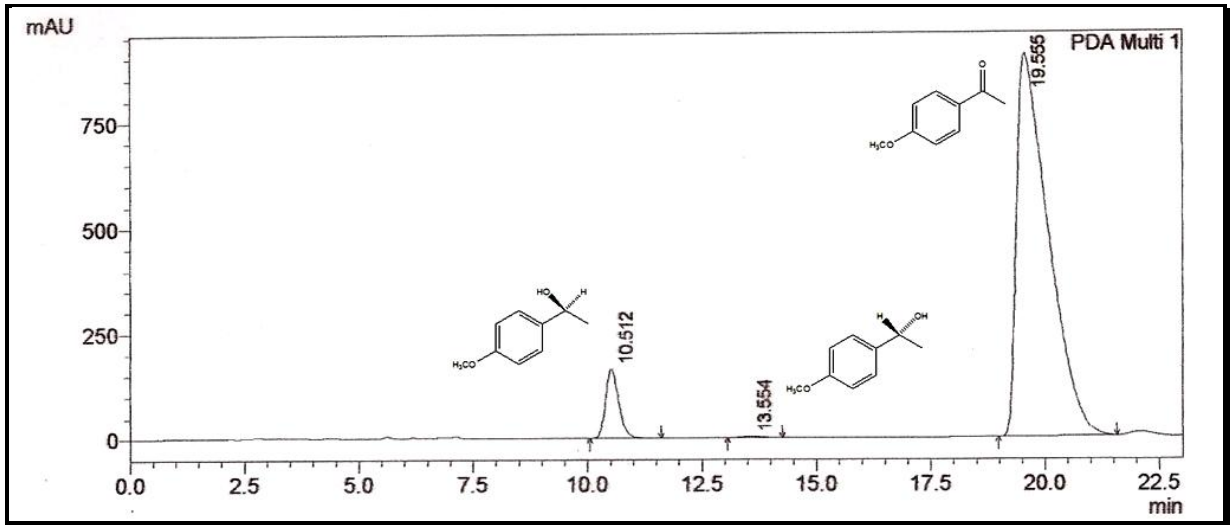


Figura 39- Cromatograma da biorredução do derivado 4-nitr-acetofenona (4a) utilizando micro-organismo I-2

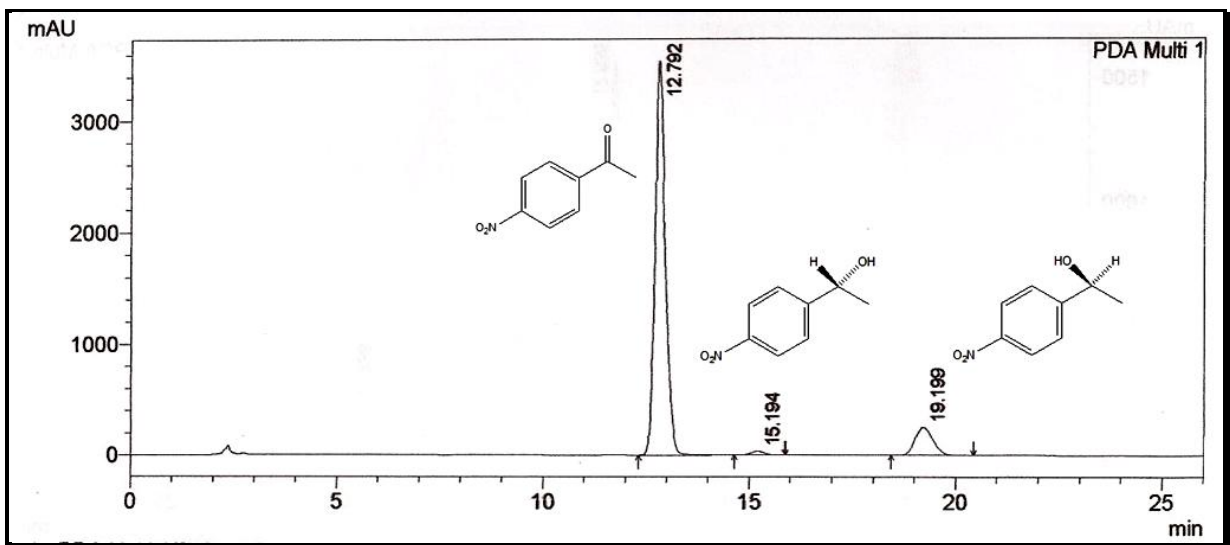
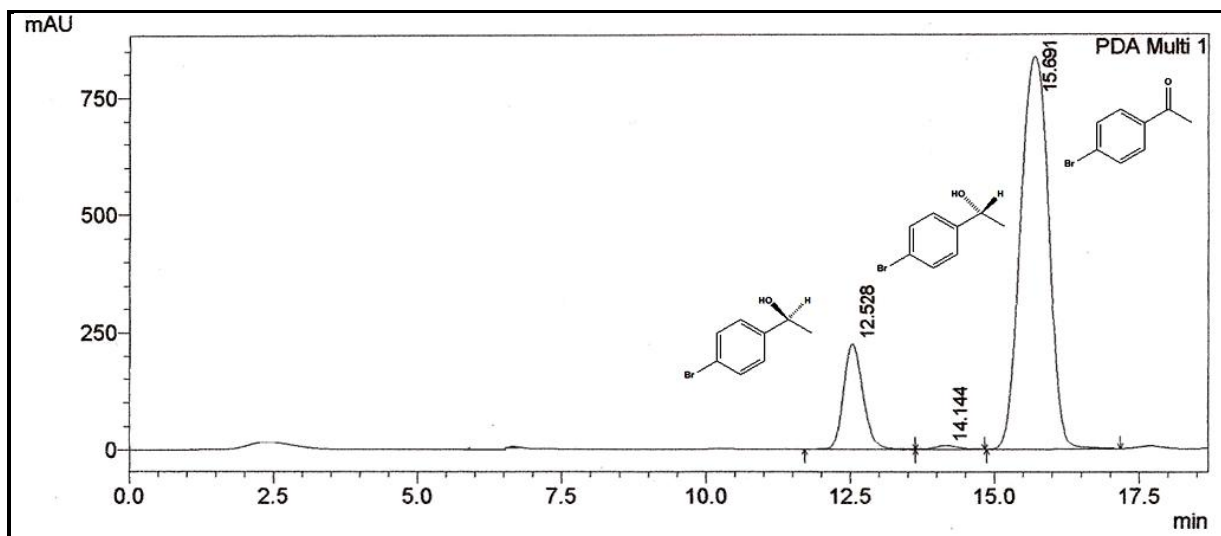


Figura 40- Cromatograma da biorredução do derivado 4-bromo-acetofenona (5a) utilizando micro-organismo I-2

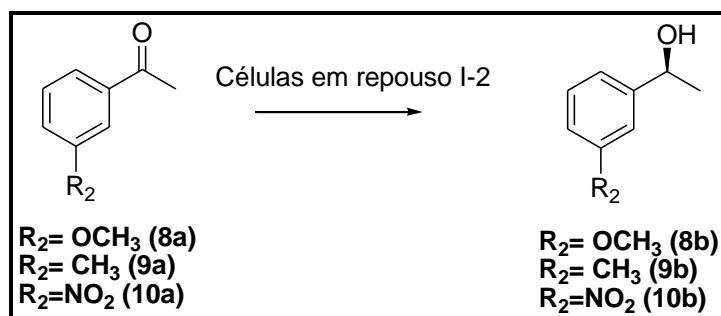


Existe relato na literatura em que a biorredução de cetonas aromáticas com substituintes halogenados cloro e bromo na posição *-para*, utilizando cepas de *Pseudomonas* sp, resultaram nos correspondentes alcoóis com excessos enantioméricos moderados entre 82-89% e conversões não satisfatórias entre 4-5% (ANDRADE et al., 2005).

3.4.2 Cetonas aromáticas *-meta* substituídas

Foram realizadas as reações de biorredução com derivados da acetofenona com substituintes na posição *-meta* com os derivados, 3-metóxi-acetofenona (**8a**), 3-metil-acetofenona (**9a**) e 3-nitro-acetofenona (**10a**), utilizando sistema de células em repouso com 1g de biomassa. A configuração absoluta foi determinada pela rotação óptica específica e comparada com a literatura (VIEIRA, et al. 2010; COMASSETO, et al. 2006; KANTAM, et al.2009). Os produtos da biorredução encontram-se representados na Figura 41.

Figura 41- Reação da biorredução utilizando cetonas aromáticas *-meta* substituída



Através da análise dos resultados obtidos que se encontram na Tabela 6, pode-se observar que o melhor excesso enantiomérico (99%) ocorre com o derivado 3-metóxi-acetofenona (**8a**) e a melhor conversão (17%) ocorre com derivado 3-metil-acetofenona (**9a**).

Tabela 6- Resultados obtidos utilizando micro-organismo I-2 na biorredução de cetonas aromáticas substituídas na posição *-meta*

Entrada	Produto	<i>e.e.</i> %	<i>c</i> %	Configuração
1	1-(3-metóxi-fenil)-etanol (8b)	99	2	<i>S</i>
2	1-(3-metil-fenil)-etanol (9b)	28	17	<i>S</i>
3	1-(3-nitro-fenil)-etanol (10b)	80	4	<i>S</i>

É possível observar que o comportamento em relação à atividade enzimática e seletividade para os derivados contendo os grupos metoxila, metila e nitro são muito semelhantes quando comparado ao obtido para os derivados contendo os mesmos grupos na posição *-para* (entradas 1,2 e 3, Tabela 6; entradas 1, 2 e 3, Tabela 5). As Figuras 42, 43 e 44 apresentam os cromatogramas da biorredução com os derivados 8a, 9a e 10 a. Cabe ressaltar que os alcoóis 8b-10b foram obtidos configuração *S*.(seletividade Prelog)

Figura 41- Cromatograma da biorredução do derivado 3-metóxi-acetofenona (8a) utilizando micro-organismo I-2

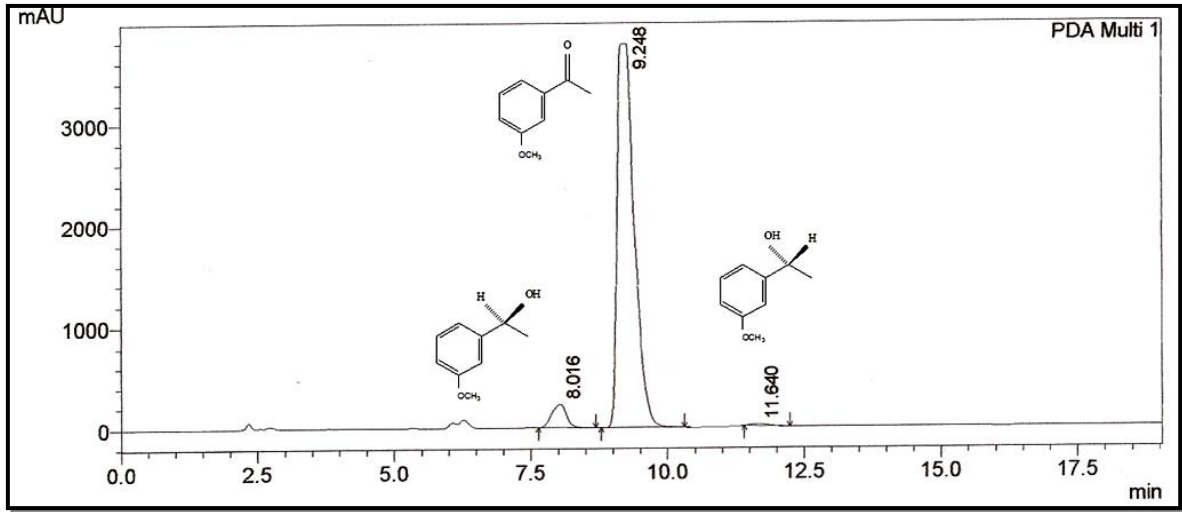


Figura 42- Cromatograma da biorredução do derivado 3-metil-acetofenona (9a) utilizando micro-organismo I-2

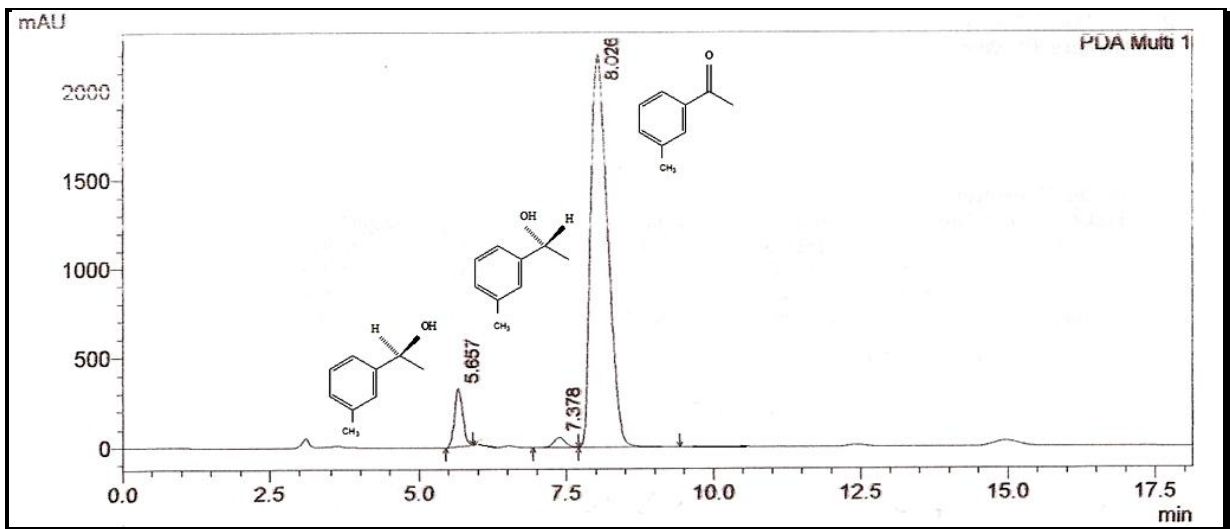
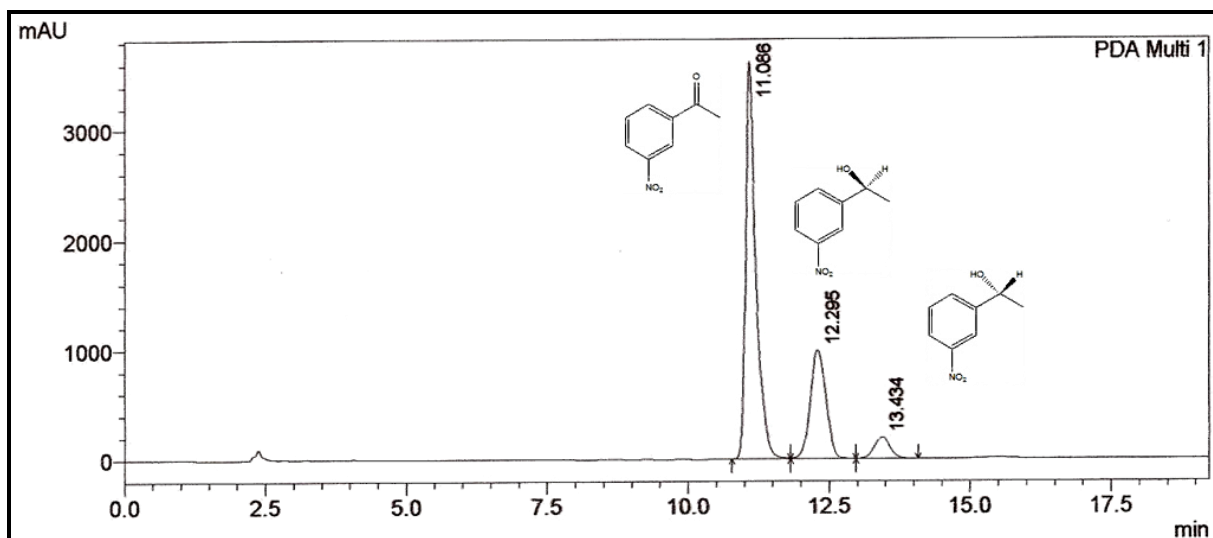


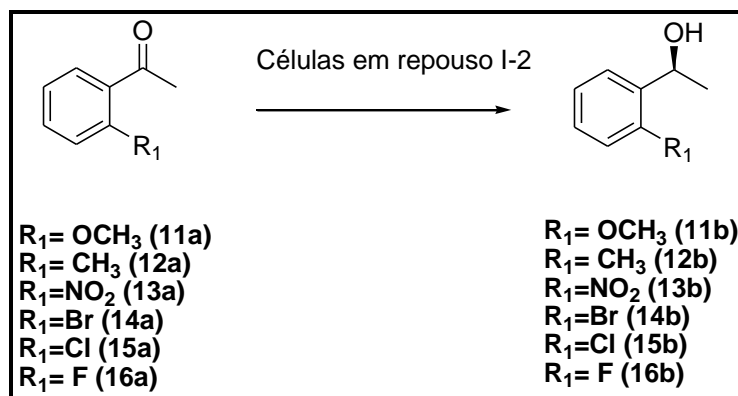
Figura 44- Cromatograma da biorredução do derivado 3-nitro-acetofenona (10a) utilizando micro-organismo I-2



3.4.3 Cetonas aromáticas –*orto* substituídas

Foram realizadas as reações de biorredução com cetonas aromáticas pró-quirais –*orto* substituídas com os derivados: 2-metóxi-acetofenona (**11a**), 2-metil-acetofenona (**12a**), 2-nitro-acetofenona (**13a**), 2-bromo-acetofenona (**14a**), 2-cloro-acetofenona (**15a**), 2-fluoro-acetofenona (**16a**), com sistemas de células em repouso com o micro-organismo I-2. A configuração absoluta foi determinada por rotação óptica específica e comparada com a literatura (VIEIRA, *et al.* 2010; COMASSETO, *et al.* 2006; KANTAM, *et al.* 2009). Os respectivos produtos encontram-se representados na Figura 45.

Figura 43- Reações de biorredução utilizando cetonas aromáticas pró-quirais –*orto* substituídas



Os valores de excesso enantiomérico variam entre excelentes (> 99%) e moderados (74%) e conversão entre valores baixos (2%) e bons (80%). Os resultados encontram-se listados na Tabela 7.

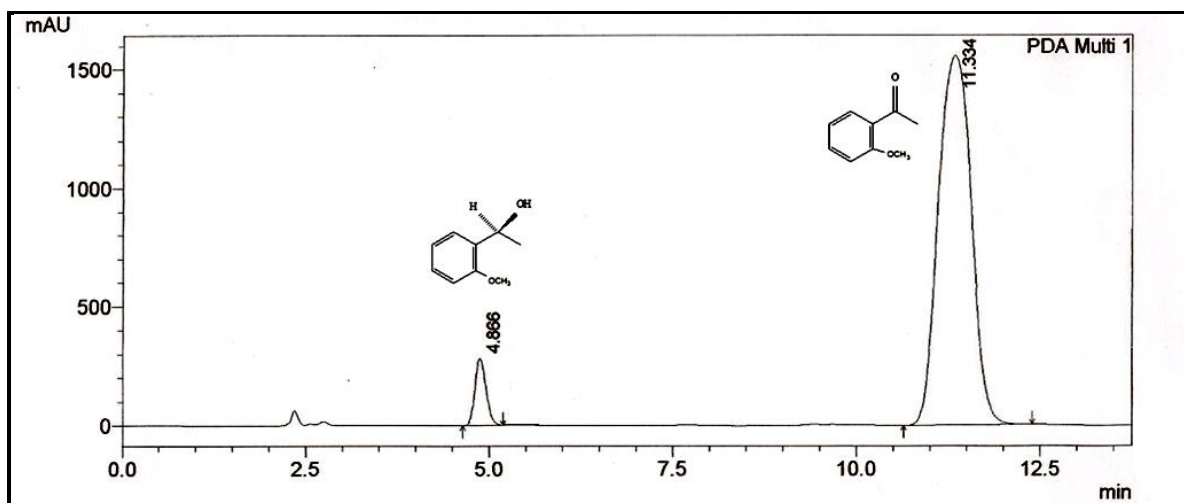
Tabela 7- Resultados obtidos utilizando micro-organismo I-2 na biorredução de cetonas aromáticas substituídas na posição *-orto*

Entrada	Produto	ee %	c %	Configuração
1	1-(2-metóxfenil)-etanol (11b)	> 99	23	S
2	1-(2-metilfenil)-etanol (12b)	95	62	S
3	1-(2-nitrofenil)-etanol (13b)	> 99	65	S
4	1-(2-bromofenil)-etanol (14b)	94	80	S
5	1-(2-clorofenil)-etanol (15b)	74	23	S
6	1-(2-fluorofenil)-etanol (16b)	89	2	S

É possível observar que quando os grupos metoxila, metila e nitro encontram-se na posição *-orto*, ocorre um aumento na atividade enzimática em comparação aos derivados contendo os mesmos grupos nas posições *-para* ou *-meta*, (comparar entradas 1, 2 e 3 da Tabela 7 com entradas 1, 2 e 3 das Tabelas 5 e 6).

O grupo metoxila mantém uma alta seletividade, independentemente da posição ocupada no anel aromático (comparar a entrada 1 nas Tabelas 5, 6 e 7). A Figura 46 apresenta o cromatograma de biorredução 11a.

Figura 44- Cromatograma da biorredução do derivado 2-metóxi-acetofenona (11a) utilizando micro-organismo I-2



Com relação aos grupos metila e nitro observa-se um aumento na seletividade comparada aos grupos posicionados em *-para* e *-meta* (comparar entradas 2 e 3 nas Tabelas 5,6 e 7). As Figuras 47 e 48 apresentam os cromatogramas da biorredução com os derivados 12a e 13a.

Figura 45-Cromatograma da biorredução do derivado 2-metil-acetofenona (12a) utilizando micro-organismo I-2

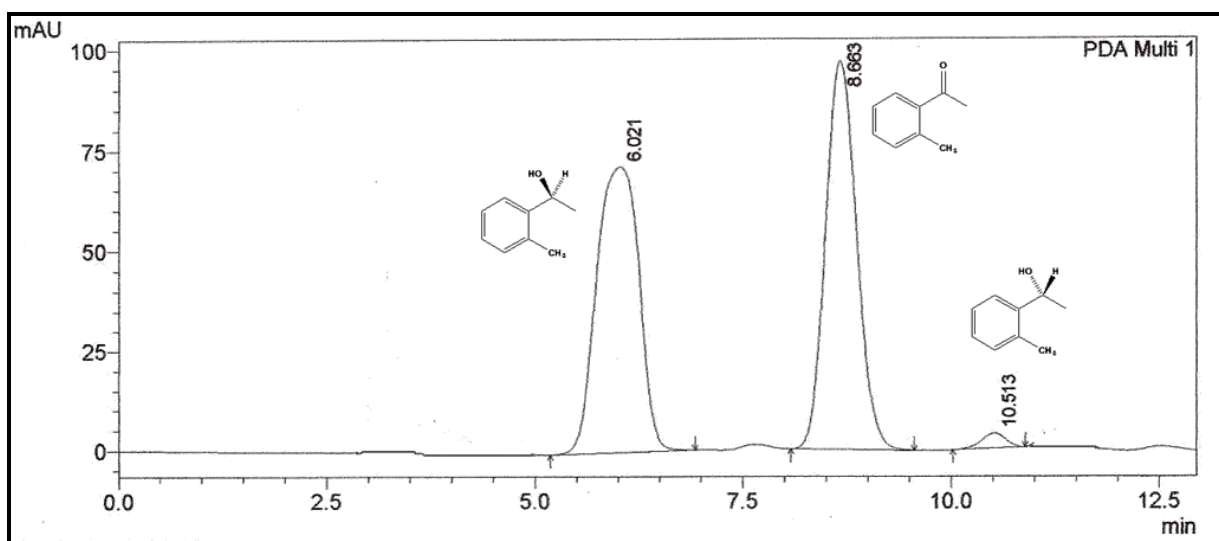
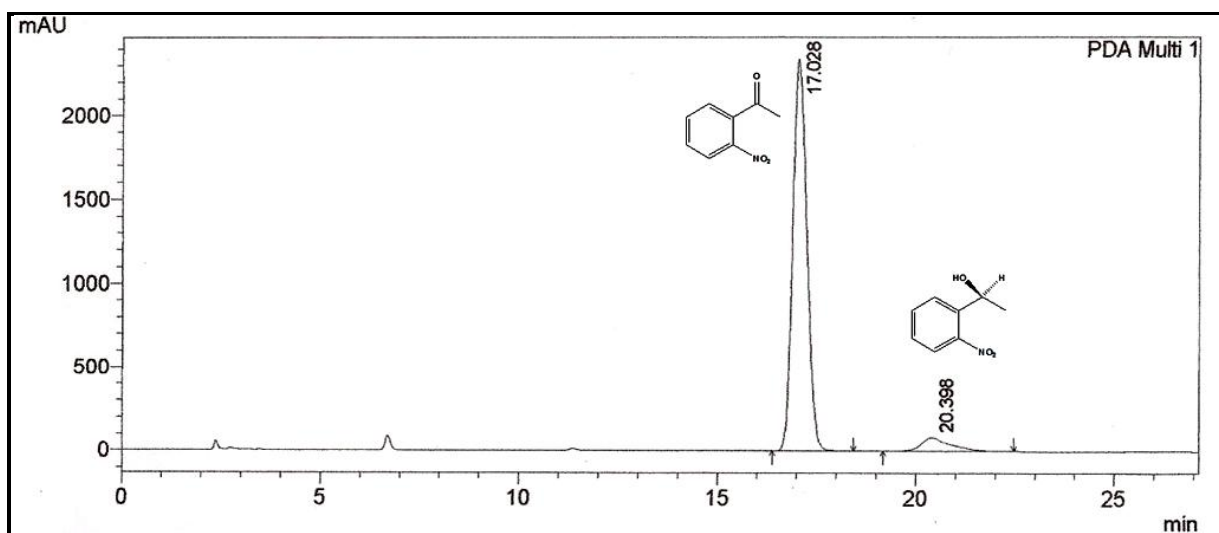


Figura 46- Cromatograma da biorredução do derivado 2-nitro-acetofenona (13a) utilizando micro-organismo I-2



Em relação aos derivados halogenados é possível observar os seguintes comportamentos:

i. A seletividade mantém-se semelhante para o derivado bromado (94%) e fluorado (89%), na posição *-orto*, quando comparado com os mesmos derivados, posicionados em *-para* (92%) e (83%), respectivamente. As Figuras 49 e 50 apresentam o cromatograma da biorredução dos derivados 14a e 16a.

Figura 47- Cromatograma da biorredução do derivado 2-bromo-acetofenona (14a) utilizando micro-organismo I-2

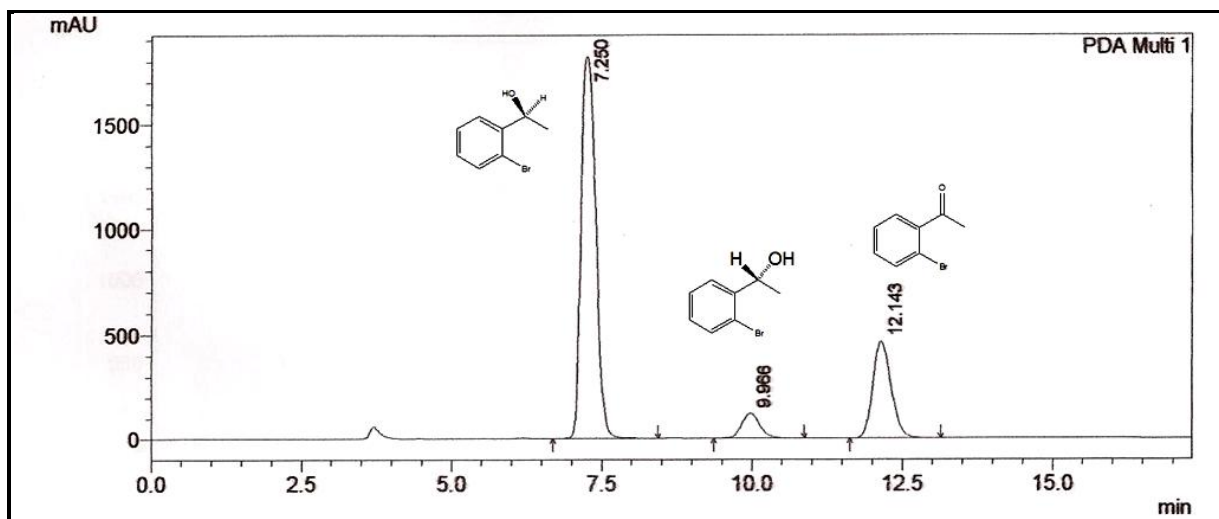
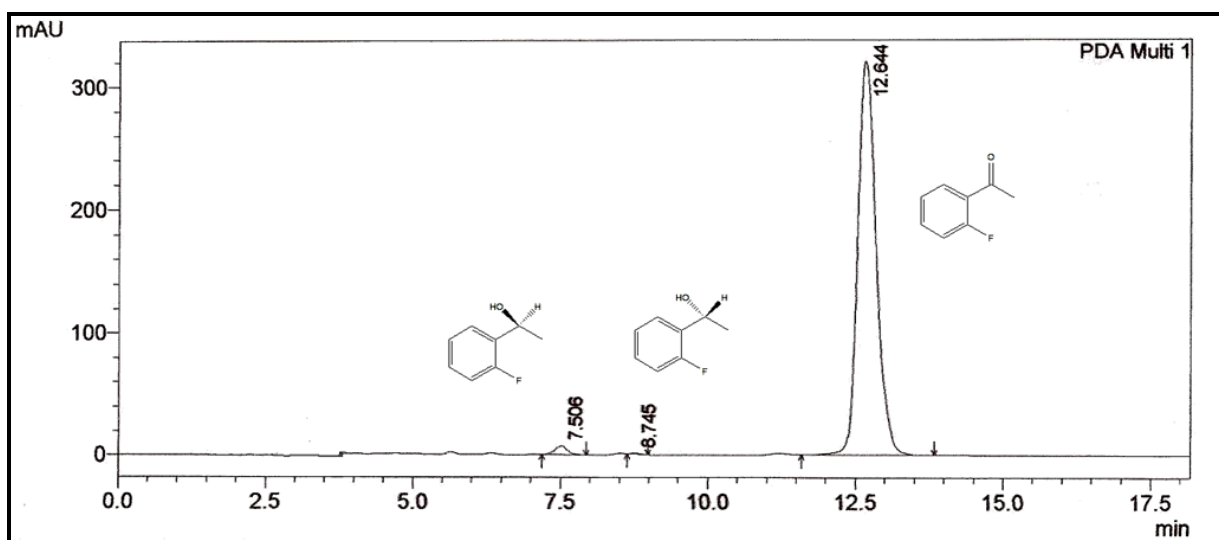
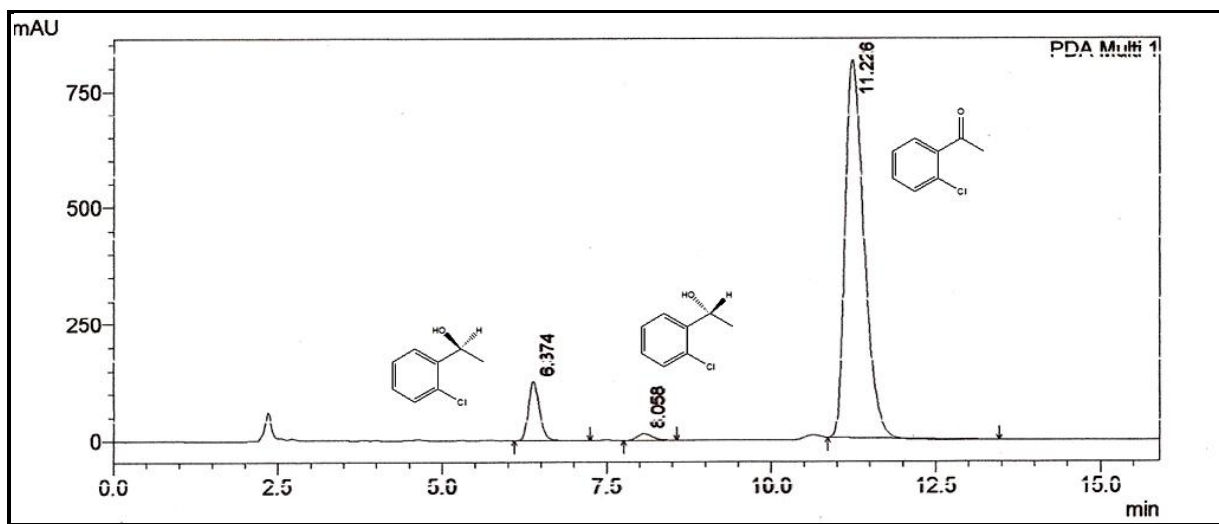


Figura 48- Cromatograma da biorredução do derivado 2-fluoro-acetofenona(16a) utilizando micro-organismo I-2



ii. A atividade enzimática aumenta com o aumento do volume do átomo de halogênio na posição *-orto* (entrada 4, 5 e 6 Tabela 7). A Figura 51 apresenta o cromatograma da biorredução com derivado 15a.

Figura 49- Cromatograma da biorredução do derivado 2-cloro-acetofenona (15a) utilizando micro-organismo I-2



Capítulo 4

Considerações Finais

4.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O isolamento de micro-organismos utilizando substrato orgânico como indutor enzimático, foi de alta relevância para obtenção de micro-organismos com a enzima desejada ativada.

Dentre os micro-organismos isolados apenas o I-2, identificado como *Pseudomonas* sp, apresentou resultados satisfatórios quanto ao excesso enantiomérico (93%) e conversão (74%) utilizando como substrato padrão a acetofenona (1a).

A reação de biorredução da acetofenona, na presença do micro-organismo *Pseudomonas* sp, se processou mais rapidamente (4 dias) em sistema de células em repouso quando comparado com sistema de células em crescimento (8 dias). Cabe ressaltar, que as melhores condições reacionais para a realização da biorredução da acetofenona foram as seguintes: 1 g de células em repouso de *Pseudomonas* sp, ressuspendidas em tampão pH 7, temperatura de 28 °C e rotação 175 r.p.m por 4 dias.

O estudo da biorredução foi estendido para derivados da acetofenona contendo substituintes no anel aromático nas posições *-orto*, *-meta* e *-para*. Os correspondentes álcoois foram obtidos com seletividade Prelog (configuração *S*).

Com relação aos substituintes metoxila, metila, nitro e bromo, os melhores resultados de seletividade e atividade enzimática ocorreram para os derivados da acetofenona *-orto* substituídos. Por outro lado, no que diz respeito aos substituintes cloro, flúor, os melhores resultados de seletividade e atividade enzimática foram observados para os derivados *-para* substituídos. Foi possível observar que o aumento do tamanho do átomo de halogênio (flúor, cloro e bromo), posicionado em *-orto*, levou a um aumento na atividade enzimática.

Finalmente, com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que o micro-organismo I-2, *Pseudomonas* sp, demonstrou ser um eficiente biocatalisador frente à redução de cetonas pró-quirais, para a obtenção dos correspondentes álcoois enantiomericamente puros. A prospecção enzimática de micro-organismos é uma oportunidade de expandir as fontes enzimáticas locais para a utilização em processos biocatalíticos de menor custo sem a necessidade de adição de cofatores.

Capítulo 5

Procedimiento Experimental

5.0 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

5.1 Material utilizado

As quantificações de massa foram realizadas utilizando balança analítica Ohaus Analytical Plus.

Os meios de cultura líquidos foram agitados em mesa agitadoras CIENTEC modelo CT-165.

As reações foram realizadas em shaker CIENTEC modelo CT-712R.

Os solventes utilizados nas reações, tratamento de reações e colunas cromatográficas são de qualidade P.A. e de procedência comercial da Synth. Os reagentes utilizados no tratamento reacional: sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) e fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4), fosfato de sódio dibásico (NaHPO_4) são de procedência comercial VETEC.

O reagente boro-hidreto de sódio (NaBH_4) é de procedência comercial Sigma. Os reagentes acetofenona e derivados são de procedência Sigma.

5.2 Métodos de análise

As análises para obtenção dos espectros e cromatogramas, incluindo Cromatografia de Alta Eficiência (CLAE), espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), foram realizadas na Central Analítica do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará.

5.3 Polarímetro

As análises das rotações ópticas foram realizadas no LABS- Laboratório de Biotecnologia e Síntese Orgânica em um polarímetro modelo Perkin- Elmer 341, equipado com lâmpada de sódio (Na), λ 589nm. As amostras foram diluídas em CHCl_3 e os experimentos foram realizados a 20°C.

5.4 Cromatografia de camada delgada

Para cromatografia em camada delgada (CCD) foram utilizadas cromatoplasmas de gel de sílica 60 ($\Phi = 2-25\mu\text{m}$) sobre poliéster T-6145 provenientes da marca SIGMA CHEMICAL CO com camada de 250 μm de espessura e dimensões de 10x5 cm.

Após eluição das substâncias nas cromatoplasmas, realizou-se o processo de revelação através de pulverização com solução de vanilina ($C_8H_8O_3$, 5,0 g) e ácido perclórico ($HClO_4$, 0,75 mol/L, 100 mL) em etanol (C_2H_5O , 100 ml) seguida de aquecimento a $100^\circ C$ com pistola aquecedora da marca Steinel modelo HL500, por aproximadamente 1 minuto.

5.5 Cromatografia em coluna

Após as reações, os produtos reacionais, foram purificados em coluna cromatográfica utilizando como adsorvente gel de sílica 60 ($\Phi = 0,025-0,020mm$), código 45 337, de procedência VETEC. O comprimento e diâmetro das colunas variaram de acordo com a quantidade de amostra a ser purificada. Como eluentes foram usados hexano e acetato de etila de qualidade P.A da marca Synth, puros ou em misturas binárias.

5.6 Cromatografia líquida de alta eficiência-CLAE

A conversão e o excesso enantiomérico dos produtos de biorredução da acetofenona (**1a**) e derivados: 4-metóxi-acetofenona (**2a**), 4-metil-acetofenona (**3a**), 4-nitro-acetofenona (**4a**), 4-bromo-acetofenona (**5a**), 4-cloro-acetofenona (**6a**), 4-fluoro-acetofenona (**7a**), 3-metóxi-acetofenona (**8a**), 3-metil-acetofenona (**9a**), 3-nitro-acetofenona (**10a**), 2-metóxi-acetofenona (**11a**), 2-metil-acetofenona (**12a**), 2-nitro-acetofenona (**13a**), 2-bromo-acetofenona (**14a**), 2-cloro-acetofenona (**15a**), 2-fluoro-acetofenona (**16a**) foram determinados por cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu LC-20AT, com colunas quirais OD-H de dimensões 150 x 4,6 mm, OB-H de dimensões 150 x 4,6 mm e AS-H de dimensões 150 x 4,6 mm e detector UV-VIS Shimadzu SPD-M20A. Nas análises foram utilizadas mistura binária de hexano e isopropanol- HEX: IPA de qualidade CLAE. Os resultados foram obtidos mediante curvas de calibração, apresentadas páginas 79-82. As análises foram realizadas conforme os parâmetros apresentados na Tabela 8.

Tabela 8- Parâmetros de análise por CLAE dos substratos e produtos das reações de biorredução

Substrato/Produto	Coluna	Temp. °C	Fase móvel	FLUXO	T _R (min)
			HEX:IPA	mL/min	Cetonas/ Álcoois
(1a)/(1b)	OD-H	25	90:10	0,5	6,8/ 9,7(<i>R</i>)-11,4(<i>S</i>)
(2a)/(2b)	OB-H	25	92:8	0,8	17,3/9,3 (<i>S</i>)-11,9(<i>R</i>)
(3a)/(3b)	OB-H	25	90:10	0,6	8,1/ 6,3(<i>S</i>)-7,5(<i>R</i>)
(4a)/(4b)	AS-H	30	92:8	0,8	12,7/ 15,1(<i>S</i>)-19,1(<i>R</i>)
(5a)/(5b)	OB-H	25	92:8	0,3	15,8/ 12,5(<i>S</i>)-14,2(<i>R</i>)
(6a)/(6b)	OB-H	25	92:8	0,8	5,5/ 4,3(<i>S</i>)-4,7(<i>R</i>)
(7a)/(7b)	OB-H	25	95:5	0,5	20,8/ 15,2(<i>S</i>)-16,4(<i>R</i>)
(8a)/(8b)	OB-H	35	90:10	0,8	8,0/ 9,2(<i>S</i>)-11,6(<i>R</i>)
(9a)/(9b)	OB-H	30	90:10	0,6	8,6/ 5,7(<i>S</i>)-7,7(<i>S</i>)
(10a)/(10b)	AS-H	30	95:5	0,8	10,7/ 12,2(<i>S</i>)-13,4(<i>R</i>)
(11a)/(11b)	OB-H	30	90:10	0,8	12,4/ 4,7(<i>S</i>)-7,5(<i>R</i>)
(12a)/(12b)	OB-H	32	95:5	0,6	8,3/ 6,6(<i>S</i>)-10,4(<i>R</i>)
(13a)/(13b)	AS-H	30	98:2	0,8	18,7/ 19,7(<i>S</i>)-21,7(<i>R</i>)
(14a)/(14b)	OB-H	30	95:5	0,5	12,0/7,2(<i>S</i>)-9,8(<i>R</i>)
(15a)/(15b)	OB-H	25	92:8	0,8	10,8/ 6,2(<i>S</i>)-7,7(<i>R</i>)
(16a)/(16b)	OB-H	30	90:10	0,6	12,6/ 7,5(<i>S</i>)-8,7(<i>R</i>)

5.7 Ressonância Magnética Nuclear-RMN

Os espectros de RMN ¹H foram obtidos no Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear da Universidade Federal do Ceará (CENAUREMN/UFC), utilizando-se Espectrômetros de Bruker, modelo Avance DPX- 300 e Avance DRX-500, que operam na frequência de 300 e 500 MHz para hidrogênio, respectivamente.

A dissolução das amostras analisadas foi realizada em clorofórmio deuterado (CDCl₃).

5.8 Espectroscopia na Região do UV/VIS

As medidas de absorvância na região do ultravioleta-visível foram realizadas utilizando-se um espectrofotômetro modelo Cary 50 Conc da Varian. As leituras foram

realizadas no comprimento de onda de 600 nm, quando se utilizou meio de cultura de células em crescimento.

5.9 Esterilização e meio de cultura

A esterilização de vidrarias e meios de culturas foi realizada no Laboratório de Biotecnologia e Síntese Orgânica (LABS) – UFC.

Os procedimentos de esterilização foram realizados em autoclave vertical, PHOENIX[®] AV 75 e Soc. FABBE[®] 103 e a repicagem nos meios de cultura em capela de fluxo laminar LABCONCO[®] MOD # 8089000.

6.0 PROCESSOS BIOCATÁLITICOS

6.1 Coleta da amostra para isolamento dos micro-organismos

A planta utilizada para o isolamento dos micro-organismos é nativa da região nordeste e da família das Cactaceas. Trata-se da espécie *N. cochenillifera* (L.) Salm-Dyck, identificada com a numeração 50253, com exsiccata depositada no Herbário Prisco Bezerra (EAC) da Universidade Federal do Ceará no Centro de Ciências, Departamento de Biologia. A planta foi coletada no município de Fortaleza-Ceará, no Campus da Universidade Federal do Ceará. Realizou-se a coleta da massa vegetal (cladódio) na UFC - Centro de Ciências e Tecnologia - Campus Pici.

Coletou-se 25 g de polpa do vegetal (cladódio) foi feito o extrato com 225 mL solução tampão fosfato de pH 7. Foram realizadas diluições em série 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} do extrato em solução salina 0,9% de NaCl e em seguida estriado em placa de petri. Os micro-organismos isolados que foram testados como biocatalisadores na biorredução do substrato padrão acetofenona (**1a**) e seus derivados.

6.2 Meio de cultura empregado

Para o isolamento dos micro-organismos foi utilizado meio de batata dextrose ágar obtido comercialmente marca HIMEDIA, com 24 g de batata dextrose para 1L de água destilada e 1,5% do volume de Agar. Foram adicionados o antibiótico cloranfenicol (1mM) e o substrato acetofenona 1mM, seguidos de esterilização.

Para obtenção da biomassa foi preparado meio de cultura batata dextrose, utilizando 200 g de batata inglesa descascada em 1 L de água destilada em cozimento. Depois

de cozida, a água do cozimento foi separada por filtração, seguido de adição de 20 g de glicose. Os meios de cultura foram autoclavados a 121°C por 15 minutos.

6.3 Isolamento dos micro-organismos

Foram realizados os plaqueamentos em meio batata dextrose ágar (descrito no item 6.2) e adicionado 1 mL de cada diluição descrita no item 6.1, seguido de estriamento com alça de Drigalski. As placas foram lacradas e ficaram em observação até o aparecimento das primeiras colônias de micro-organismo. Todos os plaqueamentos foram realizados em duplicata.

A análise das colônias isoladas crescidas foi realizada com auxílio do microscópio óptico no Centro de Ciências na Universidade Federal do Ceará no Departamento de Microbiologia. Para obtenção dos micro-organismos puros, as colônias puras foram semeadas em placas de petri contendo meio sólido BDA com adição de 1mM de cloranfenicol e 1mM de acetofenona.

6.4 Conservação dos micro-organismos

Uma colônia de cada micro-organismo puro e isolado foi inoculada em tubo de ensaio com meio BDA, para manter controle e repicada quinzenalmente.

6.5 Procedimento de otimização da biorredução

6.5.1 Triagem dos micro-organismos utilizando células íntegras em crescimento

Os micro-organismos isolados I-1, I-2, I-3, I-4 foram utilizadas como fonte enzimática. As culturas foram diluídas em solução salina 0,9 % NaCl e analisadas em espectroscopia de absorvância Uv/vis em comprimento de onda de 600nm com absorbância de 0,5. Foram inoculados 1 mL da solução inicial em erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de meio BD esterelizado com adição de 20 µL do substrato (acetofenona). Em seguida os frascos foram vedados e submetidos à agitação em mesa agitadora a uma velocidade de 175 r.p.m a 28 °C durante períodos de 8 dias. Todas as reações foram realizadas em duplicata.

6.5.2 Meio reacional

6.5.2.1 Células íntegras em crescimento do micro-organismo I-2 isolado do cacto

Foram inoculados 1 mL da referida solução (descrita no item 6.5.1) em erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL da meio BD esterilizado, seguido da adição de 20 μ L de substrato (acetofenona). Em seguida os frascos foram vedados e submetidos a agitação em mesa agitadora a uma velocidade de 175 r.p.m a 28 °C durante períodos de 2, 4, 6 e 8 dias. As quantidades de biomassa obtidas a cada término das reações foram determinadas com 2 dias de reação, 1,5 g de biomassa, e com 4 dias de reação, 2,4 g de biomassa mantendo-se constante até o oitavo dia reacional. Todas as reações foram realizadas em duplicata.

6.5.2.2 Células íntegras em repouso do micro-organismo I-2 isolado do cacto.

O micro-organismo I-2 utilizado como fonte enzimática, foi inoculado em erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de meio BD estéril e colocado em mesa agitadora a uma velocidade de 175 r.p.m por 3 dias para adquirir uma quantidade de biomassa necessária para análise. Após o período de crescimento, os meios foram centrifugados e as células em repouso (1 g ou 2 g) foram ressuspensas em 50 mL de solução tampão fosfato pH 7 com solução de dextrose 10%(v/v) e 20 μ L de substrato acetofenona. Em seguida os meios reacionais foram colocados em mesa agitadora, com velocidade de 175 r.p.m por períodos de 2, 4, 6, e 8 dias, a 28 °C. As reações foram realizadas em duplicata.

6.5.2.3 Células imobilizadas do micro-organismo I-2 isolado do cacto.

Foi realizado o mesmo procedimento descrito no item 6.5.2.2, apenas modificando a etapa após a centrifugação, pois a biomassa (1 g) obtida de células em repouso foi diluída em solução de alginato de sódio 1%(v/v) por 1 hora. Em seguida a referida solução foi gotejada em solução de cloreto de cálcio 5% (v/v), com auxílio de uma seringa e posterior repouso por 12 horas. Após esse procedimento, as esferas obtidas foram lavadas com solução tampão fosfato pH=7 e adicionadas em erlenmeyers de 125 mL contendo 50 mL de tampão com dextrose 10 % (v/v) e 20 μ L do substrato (acetofenona). O sistema reacional foi agitado por períodos de 24, 48, 72, 96 horas, em mesa agitadora, com velocidade de 175 r.p.m a 28 °C. Todas as reações foram realizadas em duplicata.

6.5.3 Meio tamponante: pH 6,0; 7,0 e 8,0

O micro-organismo I-2 foi inoculado em erlenmeyers de 250 mL contendo meio BD, e colocado para crescimento por 72 horas. Após esse tempo, as células foram centrifugadas, obtendo biomassa de 1 g para cada reação. Essa biomassa foi adicionada em erlenmeyers de 125 mL contendo 50 mL de solução tampão, previamente preparada a partir de sais ácidos ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$) com valores de pH 6,0, 7,0 e 8,0. Em seguida foi adicionado a solução dextrose 10% (v/v) e 20 μL de substrato (acetofenona). Os frascos foram vedados e submetidos à agitação em mesa agitadora a uma velocidade de 175 r.p.m pelo período de 4 dias. Todas as reações foram realizadas em duplicata.

6.5.4 Temperatura da reação: 23 °C, 28 °C e 33 ° C.

O micro-organismo I-2 foi inoculado em erlenmeyers de 250 mL contendo meio BD, e colocado em crescimento por 72 horas. Após este tempo as células foram centrifugadas, obtendo biomassa de 1g para cada reação. Essa biomassa foi colocada em erlenmeyeres de 125 mL contendo 50 mL de solução tampão previamente preparada a partir de sais ácidos ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$) com pH 7,0, com adição de dextrose 10%(v/v) e 20 μL do susbtrato acetofenona. Os frascos foram vedados e submetidos a agitação a uma velocidade de 175 r.p.m durante 4 dias nas seguintes temperatura 23°, 28°, 33°. Todas as reações foram realizadas em duplicata.

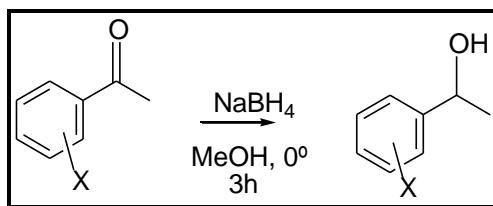
6.6 Substratos selecionados nas reações de biorredução utilizando o micro-organismo I-2.

Após o processo de otimização de meio de cultura, quantidade de biomassa, meio tamponante e temperatura, com a obtenção de melhores valores de excesso enantiomérico e conversão para o padrão acetofenona (**1a**), selecionou-se os seguintes derivados: 4-metóxi-acetofenona (**2a**), 4-metil-acetofenona (**3a**), 4-nitro-acetofenona (**4a**), 4-bromo-acetofenona (**5a**), 4-cloro-acetofenona (**6a**), 4-fluoro-acetofenona (**7a**), 3-metóxi-acetofenona (**8a**), 3-metil-acetofenona (**9a**), 3-nitro-acetofenona (**10a**), 2-metóxi-acetofenona (**11a**), 2-metil-acetofenona (**12a**), 2-nitro-acetofenona (**13a**), 2-bromo-acetofenona (**14a**), 2-cloro-acetofenona (**15a**), 2-fluoro-acetofenona (**16a**). Estes substratos foram submetidos á biorredução na presença do micro-organismo I-2.Todas as reações de biorreduções foram realizadas em duplicata.

6.7 Obtenção dos álcoois padrões por via química

Os álcoois padrões racêmicos (**1b-16b**), Figura 52, foram obtidos por redução das correspondentes cetonas, utilizando 1:4 mmol (cetona: boro-hidreto de sódio), dissolvidos em 12 mL de metanol P.A, sob agitação magnética em sistema resfriado por banho de gelo por 3 horas. A reação foi acompanhada por cromatografia de camada delgada, utilizando placas de gel de sílica e reveladas em vanilina. Após a finalização da reação, o excesso de boro-hidreto foi neutralizado adicionando cuidadosamente HCl (0,1M) com posterior evaporação do metanol, sob pressão reduzida. O produto foi extraído com AcOEt (3 X 2 mL). A fase orgânica foi secada com sulfato de sódio anidro e o solvente evaporado sob pressão reduzida. O produto da reação foi purificado por cromatografia em gel sílica utilizando como fase móvel a mistura binária de HEX:AcOEt (8:2). Os produtos foram identificados através de RMN.

Figura 50- Esquema reacional para preparação dos álcoois padrões



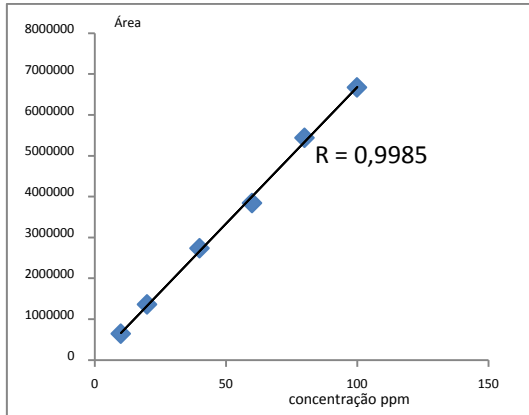
6.8 Procedimento para calcular o excesso enantiomérico e conversão

Os cálculos dos excessos enantioméricos dos produtos obtidos nas reações de biorredução de cetonas pró-quirais, foram realizados através das análises dos cromatogramas obtidos por CLAE. As áreas dos picos referentes aos álcoois foram comparadas de acordo com a equação abaixo.

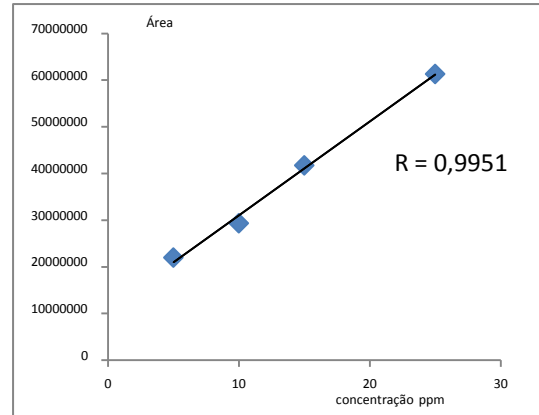
$$e.e (\%) = \frac{\text{área do enantiômero majoritário} - \text{área do enantiômero minoritário}}{\text{área do enantiômero majoritário} + \text{área do enantiômero minoritário}} \times 100\%$$

As análises das conversões dos substratos acetofenona (**1a**) e derivados utilizados na biorredução foram realizadas por intermédio das curvas de calibração que se encontram no capítulo 5, p. 79-81. Os álcoois padrões foram analisados por Cromatografia de Alta Eficiência (CLAE) e as respectivas curvas elaboradas no Excel, para obtenção dos dados de coeficiente da reta. (Figuras 53-67)

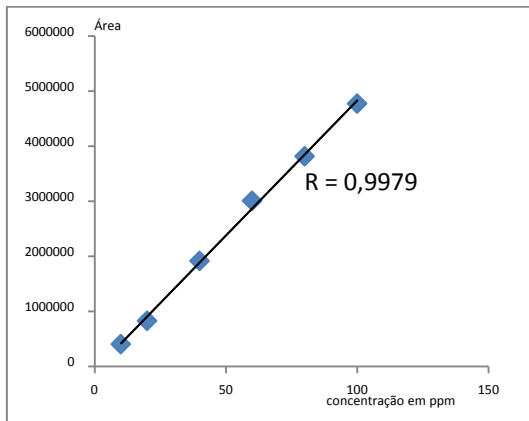
**Figura 53-Curva de calibração para
(±) 1-(4-metóxfenil)-etanol**



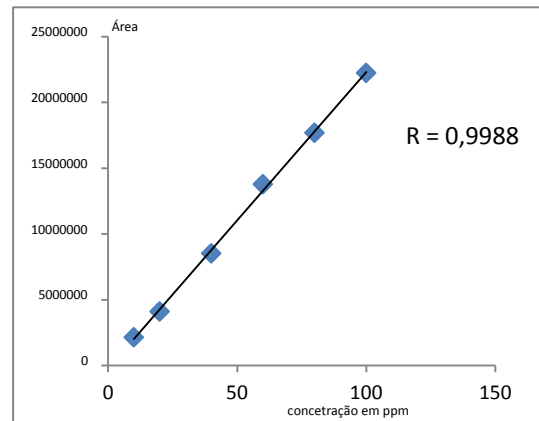
**Figura 54-Curva de calibração para
(±) 1-(4- metilfenil)-etanol**



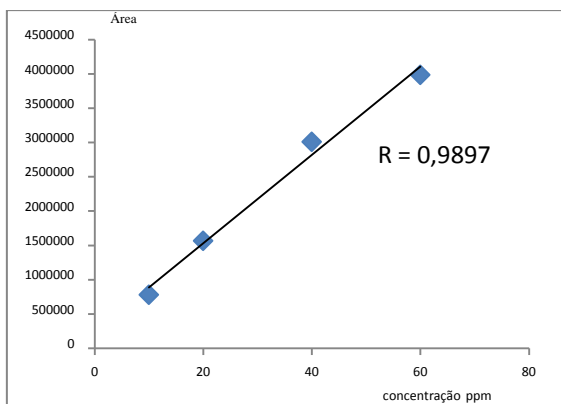
**Figura 55- Curva de calibração para
(±) 1-(4-nitrofenil)-etanol**



**Figura 56- Curva de calibração para
(±) 1-(4- bromofenil)-etanol**



**Figura 51- Curva de calibração
para (±) 1-(4-clorofenil)-etanol**



**Figura 52- Curva de calibração para
(±) 1-(4-fluorofenil)etanol**

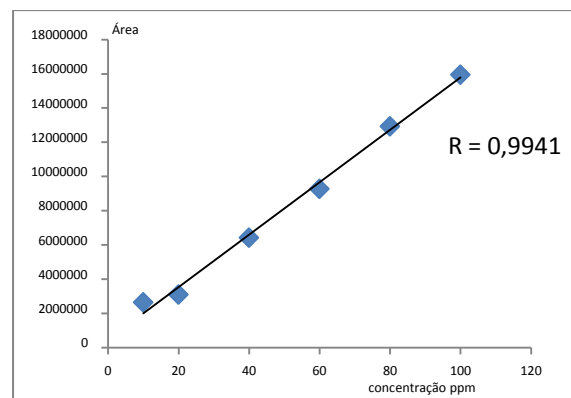


Figura 59-Curva de calibração para (±) 1-(3-metóxfenil)-etanol

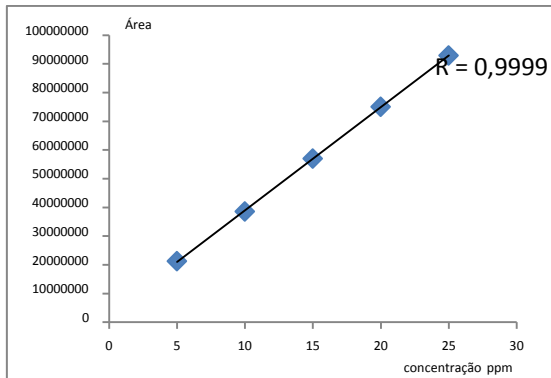


Figura 60-Curva de calibração para (±) 1-(3-metilfenil)-etanol

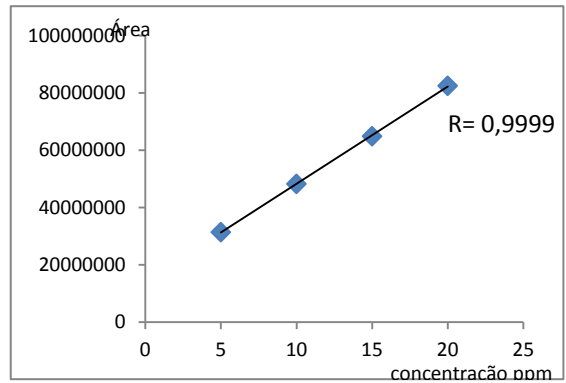


Figura 61-Curva de calibração para (±) 1-(3-nitrofenil)-etanol

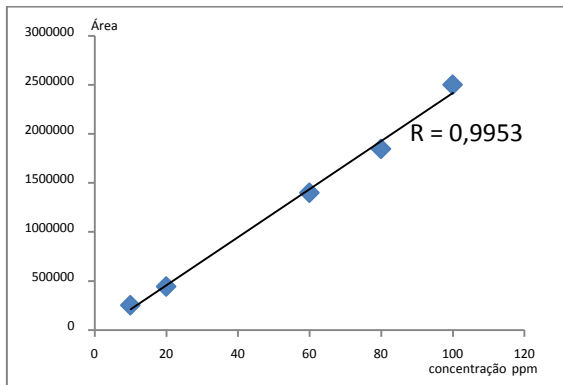


Figura 53-Curva de calibração para (±) 1-(2-metóxfenil) etanol

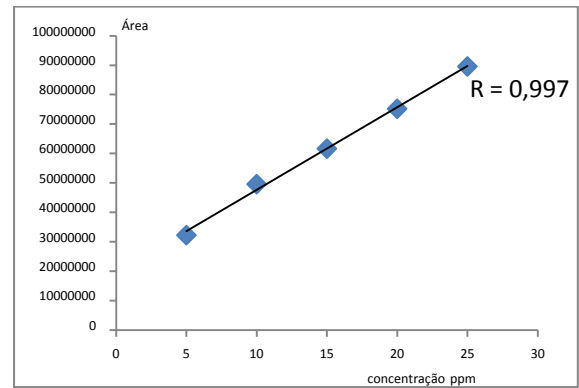


Figura 63-Curva de calibração para (±) 1-(2-metilfenil)-etanol

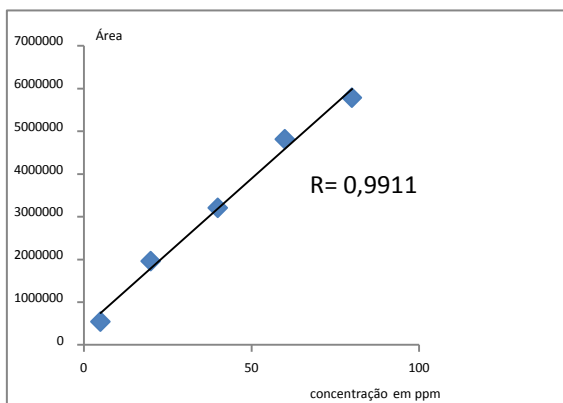
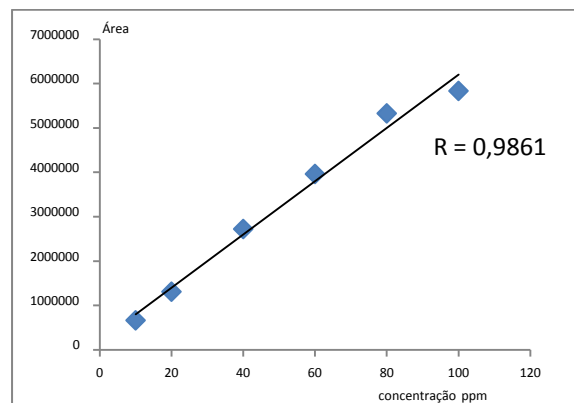
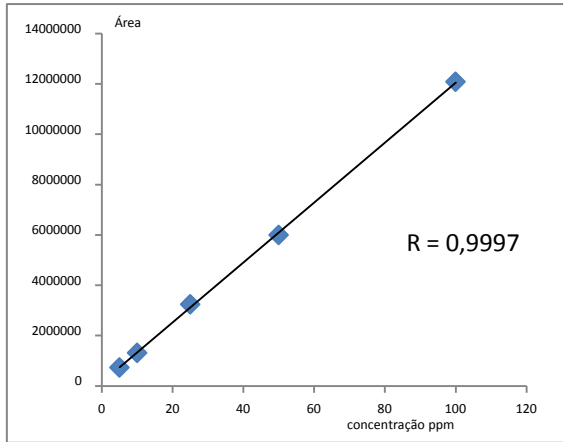


Figura 64-Curva de calibração para (±) 1-(2-nitrofenil)-etanol



**Figura 65- Curva de calibração para
(±) 1-(2-bromofenil)-etanol**



**Figura 54- Curva de calibração para
(±) 1-(2-clorofenil)-etanol**

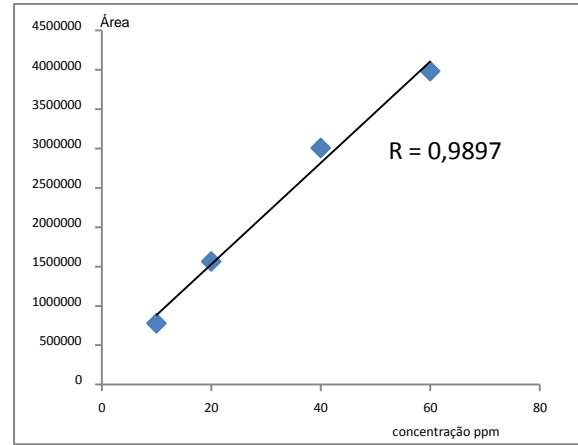
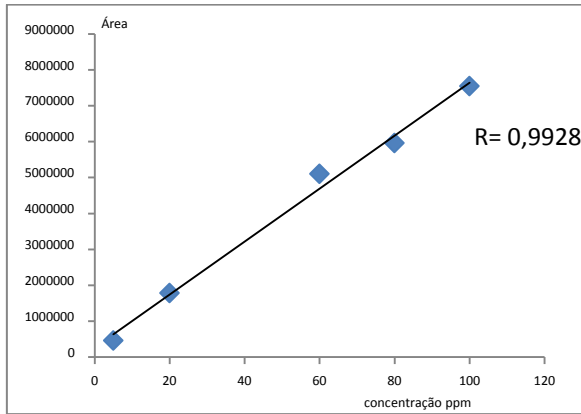
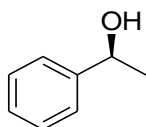


Figura 55- Curva de calibração para (±) 1-(2-fluorofenil)-etanol



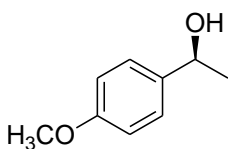
Dados de RMN ^1H e rotação óptica específica

- (S)-1-feniletanol (1b)



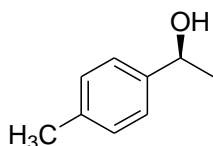
RMN ^1H (CDCl_3 , 500MHz): δ (ppm) 1,5 (d, 3H);
5,0,0 (q, 1H); 7,36-7,25(m, 5H);
 $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -33,3$ (c 0,4, CHCl_3) e.e. 89%,
literatura $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -47,0$ (c 1,1, CHCl_3) e.e. 97 %
(VIEIRA *et al.*, 2010).

- (S)-1-(4-metóxiifenil)-etanol (2b)



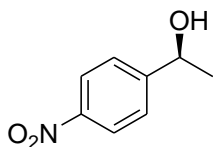
RMN ^1H (CDCl_3 , 500MHz): δ (ppm) 1,5 (d, 3H); 5,0,0 (q, 1H)
3,85(s, OCH_3); 7,29 (d, J 8,7 Hz, 2H); 6,8 (d, J 8,7 Hz, 2H);
 $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -4,8$ (c 0,3; CHCl_3) e.e. 95 %
literatura $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -2,2$ (c 0,5, CHCl_3) e.e. 9 %
(VIEIRA *et al.*, 2010).

- (S)-1-(4-metilfenil)-etanol (3b)



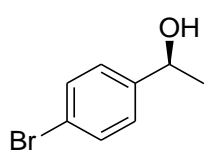
RMN ^1H (CDCl_3 , 500MHz): δ (ppm) 1,5 (d, 3H); 4,8 (q, 1H); 2,3(
3H); 7,2 (d, J 8,0 Hz, 2H); 7,2 (d, J 8,0 Hz, 2H);
 $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -26,1$ (c 0,1; CHCl_3) e. e 66%
literatura $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -37,9$ (c 2,61 CHCl_3) e.e. 80%
(KANTA *et al.*, 2009)

- (S)-1-(4-nitrofenil)-etanol (4b)



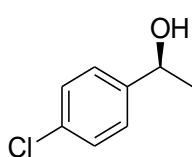
RMN ^1H (CDCl_3 , 500MHz): δ (ppm) 1,5 (d, 3H); 5,1 (q, 1H);
7,5 (d, J 9,0 Hz, 2H); 8,1 (d, J 9,0 Hz, 2H);
 $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -8,6$ (c 0,1; CHCl_3) e.e. 83 %
literatura $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -30,7$ (c 3,45, CHCl_3) e.e. 98 %
(COMASSETO *et al.*, 2006).

- (S)-1-(4-bromofenil)-etanol (5b)



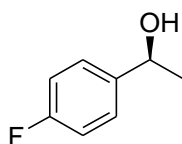
RMN ^1H (CDCl_3 , 500MHz): δ (ppm) 1,5 (d, 3H); 5,0 (q, 1H);
7,3 (d, J 8,3 Hz, 2H); 7,5 (d, J 8,3 Hz, 2H);
[α] $_D^{20}$ = - 2,1 (c 0,9; CHCl_3) *e.e.* 92 %
literatura [α] $_D^{25}$ = -44,6 (c 1,0 CHCl_3) *e.e.* 51 %
(KANTAM *et al.*, 2009)

- (S)-1-(4-clorofenil)-etanol (6b)



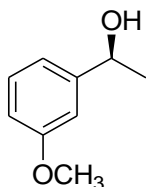
RMN ^1H (CDCl_3 , 500MHz): δ (ppm) 1,5 (d, 3H); 5,0 (q, 1H);
7,3-7,26 (m, 4H)
[α] $_D^{20}$ = - 28,2 (c 0,5; CHCl_3) *e.e.* 93%
literatura [α] $_D^{20}$ = - 32,4 (c 0,5, CH_2Cl_2) *e.e.* 62 %
(VIEIRA *et al.*, 2010).

- (S)-1-(4-fluorofenil)-etanol (7b)



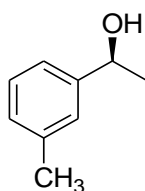
RMN ^1H (CDCl_3 , 500MHz): δ (ppm) 1,5 (d, 3H); 5,0 (q, 1H);
7,2(dd, J 8,7 Hz, 1H); 7,5 (dd, J 8,7 Hz, 1H)
[α] $_D^{20}$ = - 1,5 (c 0,1; CHCl_3) *e.e.* 83 %
literatura [α] $_D^{20}$ = - 21,2 (c 0,33, CH_2Cl_2) *e.e.* 96 %
(COMASSETO *et al.*, 2003).

- (S)-1-(3-metóxiifenil)-etanol (8b)



RMN ^1H (CDCl_3 , 500MHz): δ (ppm) 1,5 (d, 3H); 4,8 (q, 1H);
3, 85(s, OCH_3); 6,8 (dd, J 3Hz, 1H), 6.9(m, 2H); 7, 2 (t, J 6Hz, 1H)
[α] $_D^{20}$ = - 20,0 (c 0,1; CHCl_3) *e.e.* > 99%
literatura [α] $_D^{20}$ = - 21,6 (c 0,34, MeOH) *e.e.* 80 %
(VIEIRA *et al.*, 2010).

- (S)-1-(3-metilfenil)-etanol (9b)



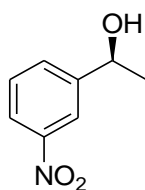
RMN ^1H (CDCl_3 , 500MHz): δ (ppm) 1,5 (d, 3H); 5,0 (q, 1H);
2,4 (s, 3H); 7,2 (s, 1H); 7,1 (dd, J 7,3 1H); 7,2(dd, J 7,3, 1H);
7,3 (td, J 7,4, 1H)

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = 2,3$ (c 0,1; CHCl_3) *e.e.* 28%

literatura $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -29,2$ (c 0,52, CHCl_3) *e.e.* 74%

(KANTAM *et al.*, 2009)

- (S)-1-(3-nitrofenil)-etanol (10b)



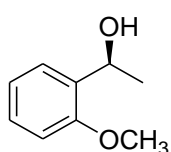
RMN ^1H (CDCl_3 , 500MHz): δ (ppm) 1,5 (d, 3H); 5,0 (q, 1H);
8,2 (dd, J 2,0 Hz, 1H); 7,7 (m, J 8,0Hz 1H); 7,5 (td, J 8,0 Hz, 1H);
8,0(m, J 8,0Hz, J 2,0 Hz, 1H);

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -8,6$ (c 0,1; CHCl_3) *e.e.* 80%

literatura $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -14,7$ (c 3,83, CHCl_3) *e.e.* 73 %

(COMASSETO *et al.*, 2006).

- (S)-1-(2-metóxfenil)-etanol (11b)



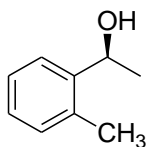
RMN ^1H (CDCl_3 , 500MHz): δ (ppm) 1,5 (3H, d); 5,1 (1H, q); 6,8
(1H, dd, $J=8,2$ Hz); 7,2 (td, J 1,6 Hz, J 7,3 Hz, 1H), 6,9(m, J 7,5
Hz, 1H); 7,3(dd, J 7,4 Hz, J 1,3 Hz, 1H)

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -22,0$ (c 0,2; CHCl_3) *e.e.* > 99%

literatura $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -4,5$ (c 0,4, CH_2Cl_2) *e.e.* 56 %

(VIEIRA *et al.*, 2010)

- (S)-1-(2-metilfenil)-etanol (12b)



RMN ^1H (CDCl_3 , 500MHz): δ (ppm) 1,5 (3H, d); 5,1 (1H, q);

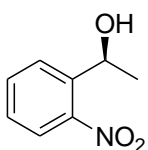
7,32-7,13 (m, 4H); 7,53-7,51(m, 1H)

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -2,0$ (c 0,1; CHCl_3) *e.e.* 95%

literatura $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -42,7$ (c 0,8, CHCl_3) *e.e.* 58 %

(KANTAM *et al.*, 2009).

- (S)-1-(2-nitrofenil)-etanol (13b)



RMN ^1H (CDCl_3 , 500MHz): δ (ppm) 1,5 (3H, d); 5,4(1H, q); 7,4

(td, J 8,0 Hz J 1,3Hz, 1H); 7,6 (td, J 1,0 Hz, J 8,0 Hz, 1H), 7,8(dd,

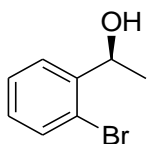
J 8,0 Hz, 1H); 7,9(dd, J 8.0 Hz, J 1,0 Hz, 1H)

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +2,8$ (c 0,5; CHCl_3) *e.e.* > 99%

literatura $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +30,6$ (c 3.06, CH_2Cl_2) *e.e.* 98 %

(COMASSETO *et al.*, 2006).

- (S)-1-(2-bromofenil)-etanol (14b)



RMN ^1H (CDCl_3 , 500MHz): δ (ppm) 1,5 (d, 3H); 5,2(1H, q); 7,1

(dd, J 7,7 Hz J 1,3 Hz, 1H); 7,3 (td, J 7,3 Hz, 1H), 7,5(d, J 8,0 Hz,

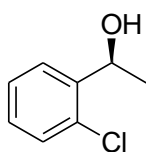
1H); 7,6(d, J 8.0 Hz, J 7,5 Hz, 1H)

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -33,3$ (c 0,4; CHCl_3) *e.e.* 92 %

literatura $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -28,5$ (c 0,98, CH_2Cl_2) *e.e.* 93 %

(KANTAM *et al.*, 2009)

- (S)-1-(2-clorofenil)-etanol (15b)



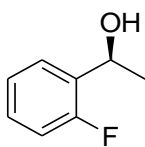
RMN ^1H (CDCl_3 , 500MHz): δ (ppm) 7,4-7,2 (m, 4H); 4,9(q, 1H)

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -16,6$ (c 0,1; CHCl_3) *e.e.* 74%

literatura $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -18,8$ (c 0,26, CHCl_3) *e.e.* 89 %

(VIEIRA *et al.*, 2010)

- (S)-1-(2-fluorofenil)-etanol (16b)



RMN ^1H (CDCl_3 , 500MHz): δ (ppm) 1,5 (3H, d); 5,2(1H, q); 7, 2 (m, 1H);

7,1 (td, J 1,0 Hz, J 7,3 Hz, 1H), 7,4(td, J 7,5 Hz, 1,6H); 7,0(dd, J 8.0 Hz, J 1,1 Hz, 1H)

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -1,6$ (c 0,1; CHCl_3) *e.e.* 89 %

literatura $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -34,7$ (c 3,83, CH_2Cl_2) *e.e.* 98 %

(COMASSETO *et al.*, 2003).

7.0 REFERÊNCIAS

ALCANTARA, A. F. C.; BARROSO, H. S.; PILÓ-VELOSO, D. Redução de amidas por boranos. **Química Nova**, v. 25, p. 300-311, 2002.

ANDRADE, L. H. *et al.* Enantioselective reduction of ortho-substituted acetophenones by bactéria strains isolated from médium enriched with biphenyl or diesel fuel. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 33, p. 73-79, 2005.

ANDRADE, L. H. *et al.* Evaluation of acetophenone monooxygenase and alcohol dehydrogenase activities in different fungal strain by biotransformation of acetophenone derivatives. **Journal of Molecular Catalysis B: enzymatic**. v.31, p. 129-135, 2004.

ANDRADE, L.H. Biocatálise. São Paulo, USP, 2008.

ARAUJO, L.F. *et al.* Equilíbrio higroscópico da palma forrageira: relação com a umidade ótima para fermentação sólida. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. v.9, n.3, p. 379-384, 2005.

ARAUJO, L.S. *et al.* Screening of microorganism producing cold-active oxidoreductase to be applied in enantioselective alcohol oxidation in Antarctic Survey. **Marine drugs**, p. 889-905, 2011.

ASANO, Y. Overview of screening for new microbial catalysts and their uses in organic synthesis-selection and optimization of biocatalysts. **Journal of Biotechnology**, v. 94, p. 65-72, 2002.

ASSUNÇÃO, J. C. C. *et al.* Sugar Cane for the Bioreduction of Carbonyl Compounds. **Journal of Molecular Catalysis. B: Enzymatic**, v. 52, p. 194-198, 2008.

BANERJEE, S.; SINGH, S.; RAHMAN, L. Biotransformation studies using hairy root cultures – a review. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 461-468, 2012.

BARBIERI, C. *et al.* Bioreduction of aromatic ketones preparation of chiral benzyl alcohol in both enantiomeric forms. **Journal of Molecular Catalysis B: enzymatic**, v. 11, p. 415-421, 2001.

BARROS, B. A. F. **Estudo químico do Basidomiceto *Lentinus Strigellus***. 2009. Tese (Doutorado em Química). Universidade Federal do Ceará. Fortaleza.

BENCZE, L. C. *et al.* Cal-B a highly selective biocatalyst for the kinetic resolution of furylbenzthazole 2yl-ethanols and acetates. **Tetrahedron: asymmetric**. v. 21, p.1999-2004, 2010.

BIANCONI, M. L. **Enzimas: o que são e como funcionam**. 2006. Disponível em: www2.bioqmed.ufrj.br/enzimas. Acessado em 03 mar. 2012.

BOLON, D. N.; VOIGH, C. A.; MAYO, S. De novo design of biocatalysts. **Current Opinion in Chemical Biology**, v.6, p. 125-129, 2002.

BOMMARIUS, A.S.; RIEBEL, B. R. **Biocatalysis: fundamentals and applications**, Wiley, 2004.

BORGES, K. B. *et al.* Stereoselective biotransformation using fungi as biocatalysts, **Tetrahedron: asymmetric**, v.20, p. 385-397, 2009

CAPAZZELLI, S.; LATTANZI, A. **Chirality**, v.15, p. 227-230, 2003.

CARVALHO, P. O. *et al.* Potencial de biocatálise enantiosseletiva de lípases microbianas. **Química Nova**, v.28, p.614-621, n.4, 2005.

COELHO, F. A. S. Farmacos e Quiralidade. **Química Nova**, n.3, 2001.

COMASSETO, V. J. *et al.* Deracemization of aryl ethanol and reduction of acetophenone by whole fungal cells of *Aspergillus terreus* CCT 4083, *A. terreus* CCT 3320 and *Rhizopus oryzae* CCT4964. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v.29, p.55-61, 2004.

COMASSETO, V. J. *et al.* Biotransformation of ortho-, meta-, and para- aromatic nitrocompounds by strains of *Aspergillus terreus*: reduction of ketones and deracemization of alcohols. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.39, p. 24-30, 2006.

COMASSETO, V.J. *et al.* Bioreduction of fluoroacetophenone by the fungi *Aspergillus terreus* and *Rhizopus oryzae*. **Tetrahedron: asymmetric**, v. 14, p. 711-715, 2003.

DOWLING, D. N.; O' GARA, F. Metabolites of *Pseudomonas* involved in the of plant diase. **Trends in Biotechnology**, v.12, p. 133-141, 1994.

FABER, K. **Biotransformations in Organic Chemistry**, 4^a ed.; Editora Springer-Verlag, Berlin, 2000.

FABER, K.; STRAUSS, U. T.; FELFER, U. Biocatalytic transformation of racematos into chiral building blocks in 100% chemical yield and 100 % enantiomeric excess. **Tetrahedron: asymmetric**. v.10, p. 107-117, 1999.

FESSER, W.; JONES, B. Biocatalysis and biotransformation from discovery to application. **Current Opinion in Chemical Biology**, v.5, p.103-105, 2001.

FILHO, A. B.; KIMAKI, H.; AMORIM, L. **Manual de fitopatologia**, v. 1, 3^aed, Agronômica São Paulo, 1995.

GANDOLFI, R. *et al.* Efficient and seletive microbial esterification with dry mycelium of *Rhizopus oryzae*. **Journal of Biotechnology**, v. 92, p. 21-26, 2001.

GHANEM, A. Trends in lipase-catalyzed asymmetric acess to enantiomerically pure/enriched compounds. **Tetrahedron**, v. 63, p. 1721-1754, 2007.

GOTOR, V.; ALFONSO, I.; GARCIA-URDIALES, E. **Asymetric organic synthesis with enzymes**. Wiley –VHC. Nerlag & Co.K Ga A, 1^aed. Weinhein; 2008.

HASAN, F.; SAHAN, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 39, p. 235-251, 2006.

HOMANN, J. M.*et al.* A. Rapid indentification of enantioseletive ketone reductions using targeted microbial librarías. **Tetrahedron**. v.60, p. 789-797, 2004.

- HOUJIN, L. *et al.* Biotransformation of limonene by marine bacteria. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, v. 34, p. 946-950, 2006.
- ILLANES, A. *et al.* Recent trends in biocatalysis engineering. **Biosource Technology**, v. 115, p. 48-57, 2012.
- ISHIHARA, K.; YAMAGUCHI, H.; NARAJIMA, N. Stereoselective reduction of keto esters: thermophilic bacteria and microbialalgae as new biocatalysts. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 23, p. 171-189, 2003.
- JURCEK, O.; WIMMEROVA, M.; WIMMER, Z. Selected chiral alcohols: enzymic resolution and reduction of convenient substrates. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 252, p. 767-781, 2008.
- KANTAM, M. Z. *et al.* Asymmetric hydrosilylation of ketones catalyzed by magnetically recoverable and reusable copper ferrite nanoparticles. **Journal Organic Chemistry**, v. 79, 2009.
- KATO, D.I.; MIYAMOTO, K.; HIROMICHI, O. Microbial deracemization of α -amino acids. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 32, p. 157-165, 2007.
- KUBARNOGLU, R. B.; ZILBEYAZ, K.; KUBARNOGLU, N. I. *Cryptococcus Larurentii* as new biocatalyst for the asymmetric reduction of substituted acetophenons. **Tetrahedron: Asymmetric**. v.22, p.345-350, 2011.
- KURBANOGLU, E. B. *et al.* Enantioselective reduction of substituted acetophenone by *Aspergillus niger*. **Tetrahedron: asymmetric**. v. 18, p. 1159-1162, 2007.
- LIN, H. *et al.* Biocatalysis as an alternative for the production of chiral epoxides: a comparative review. **Journal of Molecular Catalysis B: enzymatic**, v. 72, p. 77-89, 2011.
- MACHADO, L. L. *et al.* Bioreduction of aldehydes and ketones using *Manihot* species. **Phytochemistry**, v. 67, p. 1637-1643, 2006.
- MACZA, W. K.; MIRONOWICZ, A. Enantioselective reduction of bromo and methoxy acetophenone derivatives using carrot and celeriac enzymatic system. **Tetrahedron: asymmetric**, v. 15, p. 1965- 1967, 2004.
- MADIGAN, M. T. *et al.* **Microbiologia de Brock**, 12^aed., Artmed, 2010.
- MAJEWSKA, P.; KAFARSKI, P.; LEICZAK, B. Simple and effective method for the deracemization of ethyl 1-hydroxy phosphinate using biocatalysts with lipolytic activity. **Tetrahedron: asymmetry**, v. 17, p. 2870-2875, 2006.
- MARSAIOLI, A. J.; PORTO, A.L. M. **Biocatálise e biotransformação: fundamentos e aplicações**, Schoba, 2010.
- MATSUDA, T.; YAMANAKA, R.; NAKAMURA, K. Recent progress in biocatalysis for asymmetric oxidation and reduction. **Tetrahedron: asymmetric**, v. 20, p. 513-557, 2009.
- MEEN, V.S.; BANERJEE, U. C. A biocatalytic for regioselective monoacetylation of 3-aryloxy-1,2-propanediols by porcine pancreatic lipase. **Monatshefte Chemie**, v. 143, p. 951-953, 2012.

MELO, I. S. *et al.* Diversidade de microorganismo endofíticos e seu potencial biotecnológico. **Journal do Endofítico**, 2001. Disponível em: www.cnpma.embrapa.br. Acesso em: 20 mar. 2012.

MOTTA, V. T. **Bioquímica Básica**. Autolab: Análise Clínicas, cap. 3, p. 374, 2007.

MOUAD, A. M. *et al.* **Bioreduction of acetophenone derivatives by red marine algae *Bostrychia radians* and *B. tenella*, and bacteria associated**. *Helvetica Chimica Acta*, v.94, p. 1506-1514, 2011.

NAKAMURA, K. *et al.* Recent developments in asymmetric reduction of ketones with biocatalyst. **Tetrahedron: asymmetric**. v. 14, p. 2659-2681, 2003.

OGAWA, J.; SHIMIZU, S. Microbial enzymes: new industrial applications from traditional screening methods. **Trends in Biotechnology**, v. 17, p. 13-20, 1999.

OLIVEIRA, L. G.; MANTOVANI, S. M. Transformações biológicas contribuições e perspectiva. **Química Nova**, v.32, n.3, p. 742-756, 2009.

OLIVEIRA, M. F. **Genêro *Pseudomonas***. Rio Grande do Sul, 2008. Disponível em: www.ufrgs.br. Acesso em: 20 mar. 2012.

PEIZ, A.; RAMIREZ-BAHENA, M. H.; VELASQUEZ, E. Historical evolution and current status of the taxonomy of genus *Pseudomonas*. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 9, p. 1132-1147, 2009.

REIS, M. B. A. **Análise comparativa de proteínas expressadas sob estresse hídrico em palma forrageira (*Opuntia Cochenillifera*)**. Dissertação de Mestrado, Universidade Católica de Brasília, Brasil, 2009.

ROCHA, L. C. **Redução de derivados de acetofenonas com fungos de origem marinha**. 2008. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de São Carlos. São Paulo.

RODRIGUES, A. R. *et al.* Recent advances in the biocatalytic asymmetric reduction of acetophenone and α , β unsaturated carbonyl compounds. **Food Technology Biotechnology**. v. 42, p. 295-303, 2004.

RODRIGUES, J. A.; MORAN, P.J. Reduções enantioselectiva de cetonas utilizando-se fermento de pão. **Química Nova**, v.24, n.6, p. 893-897, 2001.

RODRIGUEZ, P. *et al.* Stereoselective biotransformation of α -alkyl- β -keto esters by endophytic bacteria and yeast. **Journal of Molecular Catalysis B: enzymatic**, v. 71, p.90-94, 2011

RODRIGUEZ, P. *et al.* Stereoselective biotransformation of α -alkyl- β -keto esters by endophytic bacteria and yeast. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 71, p. 90-94, 2011.

SAIKKONEN, K. *et al.* Evolution of endophyte-plant symbioses. **Trends in Plant Science**, v.9, p. 275-280, 2004.

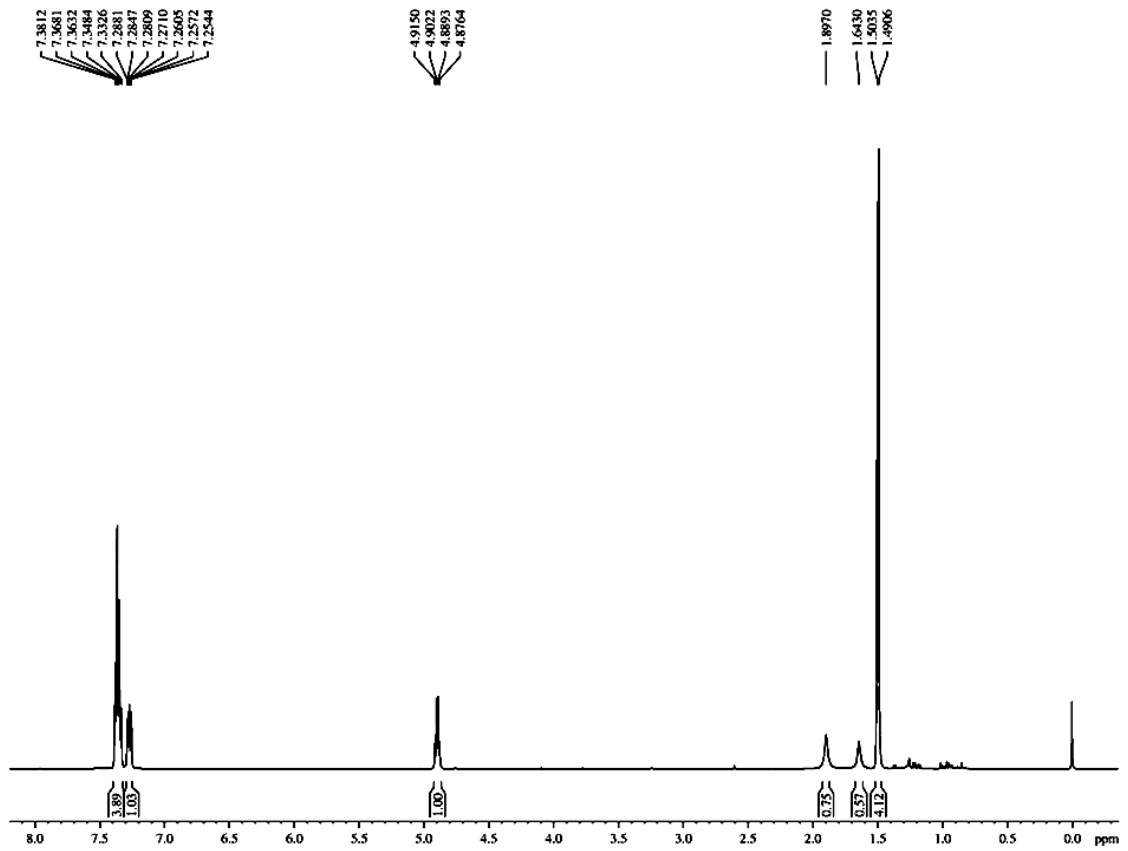
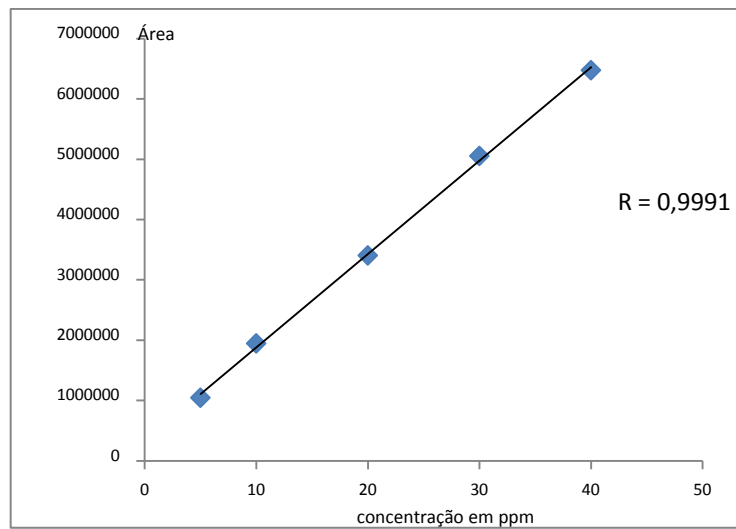
- SAKAMAKI, H. *et al.* Biotransformation of (\pm)- α -ionone and β -ionone by cultured cells of *Caragana chamlagu*. **Journal of the Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 27, p. 177-181, 2004.
- SALVI, A. N. *et al.* Biotransformation with *Rhizopus arhizus*: preparation of the enantiomers of phenylethanol and 1-(o-, m-, and p-methoxyphenylethanol). **Tetrahedron:asymmetric**, v.6, p. 2287-2290, 1995.
- SANCHEZ, S.; DEMIAN, A. L. Enzymatic and bioconversions of industrial pharmaceutical and biotechnology significance. **Organic Process Research**, v.15, p. 224-230, 2011.
- SANGLARD, D. A.; MELO, G. G. **Pesquisas com palma forrageira: panorama atual**. Disponível em: <www.cdsa.ufcg.edu.br>. Acesso set. 2011.
- SANTOS, D. C. *et al.* Estimativas de parâmetros genéticos em clones em palmas *forrageira Opuntia-Ficus indica Mill* e *Nopalea Cochenillifera Salm-Dyck*. **Revista Pesquisa Agronegócio Brasileira**. Brasília, v.29, n.12, 1994.
- SCHAFER, F. *et al.* Microbial synthesis of chiral alcohols using a novel monooxygenase. **Journal of Biotechnology**, v. 150. p. 356, 2010.
- SILVA, C. R. **Estudo de resolução cinética de álcoois secundários utilizando reação de oxidação enantiosseletiva mediada por bactérias**. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.
- SILVA, D. A. G. **Dinâmica populacional de *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* e da flora microbiana residente em plantas de pimentão submetida a pulverização com agroquímicas e biofertilizantes agrobio**. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências) Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.
- SILVA, D. V.; STAMBUK, B. U.; NASCIMENTO, M. G. Efficient chemoselective biohydrogenation of 1,3-diaryl-2-propen-1-ones catalyzed by *Saccharomyces cerevisiae* yeast in biphasic system. **Journal of Molecular Catalysis B: enzymatic**, v.63, p. 157-163, 2010.
- SINGH, M.; SINGH, R.S.; BANERJEE, C. U. Enantioselective transesterification of racemic phenyl ethanol and its derivatives in organic solvent and ionic liquid using *Pseudomonas aeruginosa* lipase. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 25-29, 2010.
- SOLTZ, A. *et al.* Enantioselective nitriles hydrates and amidases from different bacterial isolates. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, p. 137-141, 1998.
- STEWART, J. D. Organic transformations catalyzed by engineered yeast cells and related systems. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 11, p. 363-368, 2000.
- TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos**. 2ªed., Atheneu, São Paulo, 1996.
- TEMBA, E. S.C.; OLIVEIRA, I. M. F.; DONNICI, C. L. Álcoois quirais: métodos químicos e catalíticos de obtenção por redução assimétrica. **Química Nova**, v.26, p. 112-122, 2003.

- VALADEZ-BLANCO, R.; LIVINGSTON, G.A. Enantioselective whole-cell biotransformation of acetophenone to S-phenylethanol by *Rhodotorula glutinis*. **Biochemical Engineering Journal**. v. 46, p. 44-53, 2009.
- VASCONCELOS, A. G. V. *et al.* Micropropagação de palma forrageira e miúda(*Nopalea cochenillifera*-Salm Dyck). **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**. v.22, p.28-31, 2007.
- VECCHIA-DALLA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lípases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**. v. 27, p. 623-630, 2004.
- VIEIRA, G. A. B. *et al.* *Candida tropicalis* CE017: a new brazilian enzymatic Source for the bioreduction of aromatic prochiral ketones. **Journal Brazilian Chemistry Society**, v. 21, p. 1509-1516, 2010.
- VIEIRA, M. R. **Estudo da biorredução de compostos carbonílicos por linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* sp.** 2006. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Regional de Blumenau, Blumenau.
- VOLLHARDT, K. P. C.; SCHORE, N. E. **Química Orgânica- estrutura e função**, 4ªed., Bookman, 2006.
- WANG, M.; SI, T.; ZHAO, H.; Biocatalysts development by directed evolution. **Biosource Technology**, v. 115, p. 117-125, 2012.
- WANG, S. *et al.* Asymmetric hydration of ortho-or para- substituted styrenes catalyzed by biopolymer-metal complex wool-Pd. **Reactive & Functional Polymers**. v. 68, p. 424-430, 2008.
- WHALER, D.; REYMOND, J. Novel methods for biocatalysts screening. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 5, p. 152-153, 2001.
- WUBBOLTS, M.; HELD, M.; PANKE, S. Trends and innovations in industrial biocatalysis for the production of fine chemicals. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 15, p. 272-279, 2004.
- XIE, Y. *et al.* An additional coordination group leads to extremely efficient chiral iridium catalyst for asymmetric hydrogenation of ketones asymmetric hydrogenation. **Asymmetric Hydrogenation**, v. 50, p. 7329-7332, 2011.
- XIE, Y.; XU, J.; XU, Y. Isolation of a *Bacillus* strain producing ketone reductase with high substrate tolerance. **Biosource Technology**, v. 101, p. 1054-1059, 2010.
- XU, C. *et al.* Production of chiral aromatic alcohol by asymmetric reduction with vegetable catalyst. **Chinese Journal of chemical Engineering**, v.18, p.1029-1033, 2010.
- XU, Y. *et al.* Asymmetric hydrogenation of ketones using a ruthenium(II) catalyst containing BINOL- derivated monodonor phosphorus –donor ligands. **Organic Letters**, v.6, 2004.

YAN, Z. *et al.* Biocatalytic reduction of prochiral aromatic ketones to optically pure alcohols by a complexed enzyme system for cofactor regeneration. **Tetrahedron Letters**. v.52, p. 99-100, 2011.

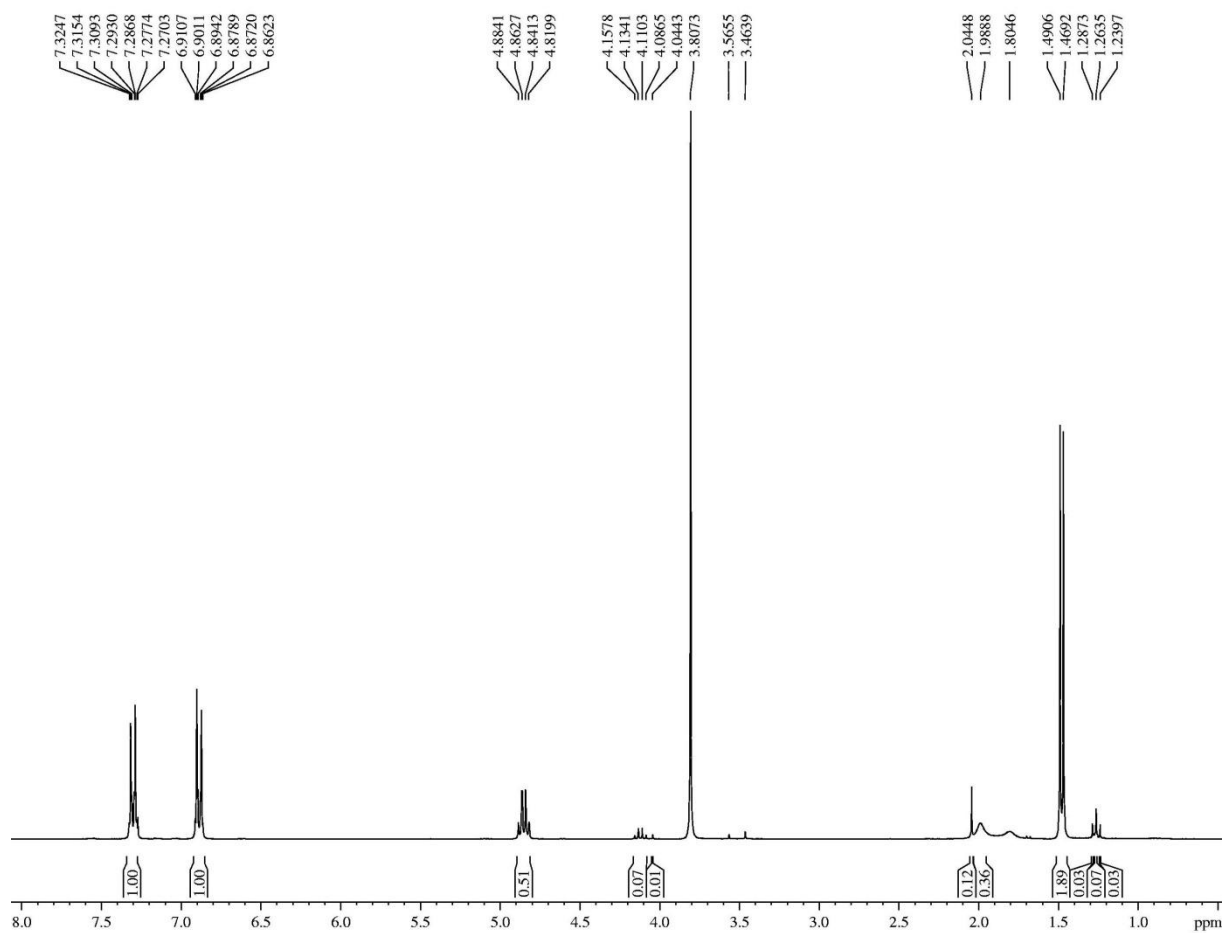
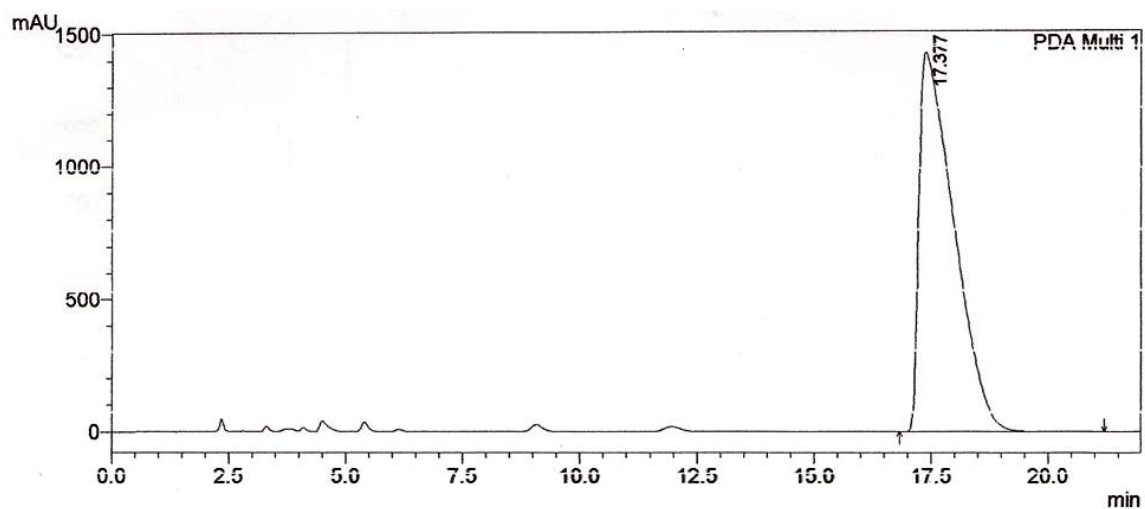
ZHU, D.; YANG, Y.; HUA, L. Stereoselective enzymatic synthesis of chiral alcohols with the use of a carbonyl reduction from *Candida magnolia* with anti-Prelog enantioselectivity. **Journal of Organic Chemistry**, v.71, p. 4202-4205, 2006.

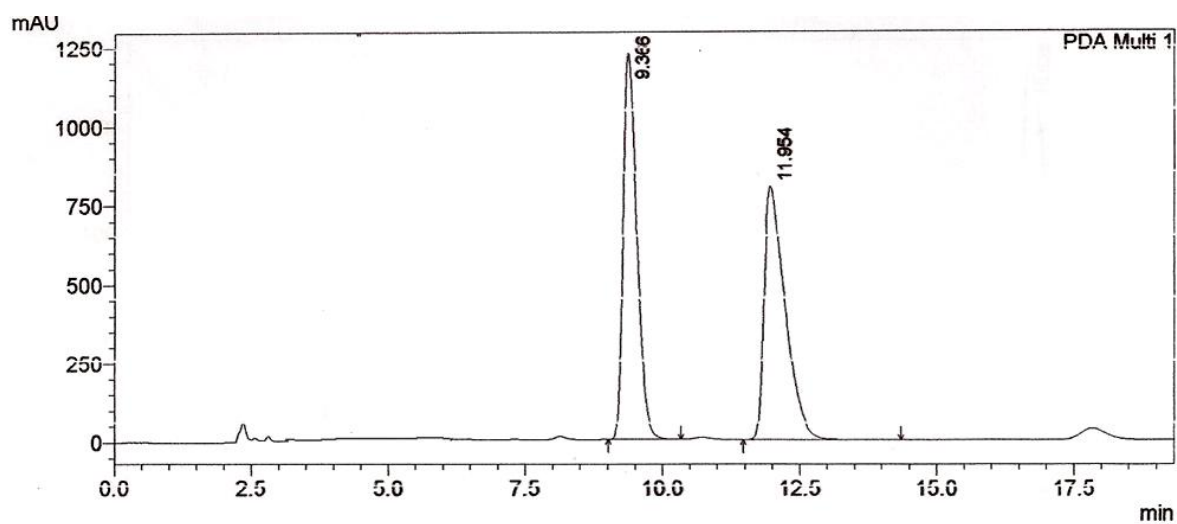
ANEXO 1

Espectro de RMN de ^1H (500 Hz, CDCl_3) do feniletanol

Curva de calibração do 1-feniletanol

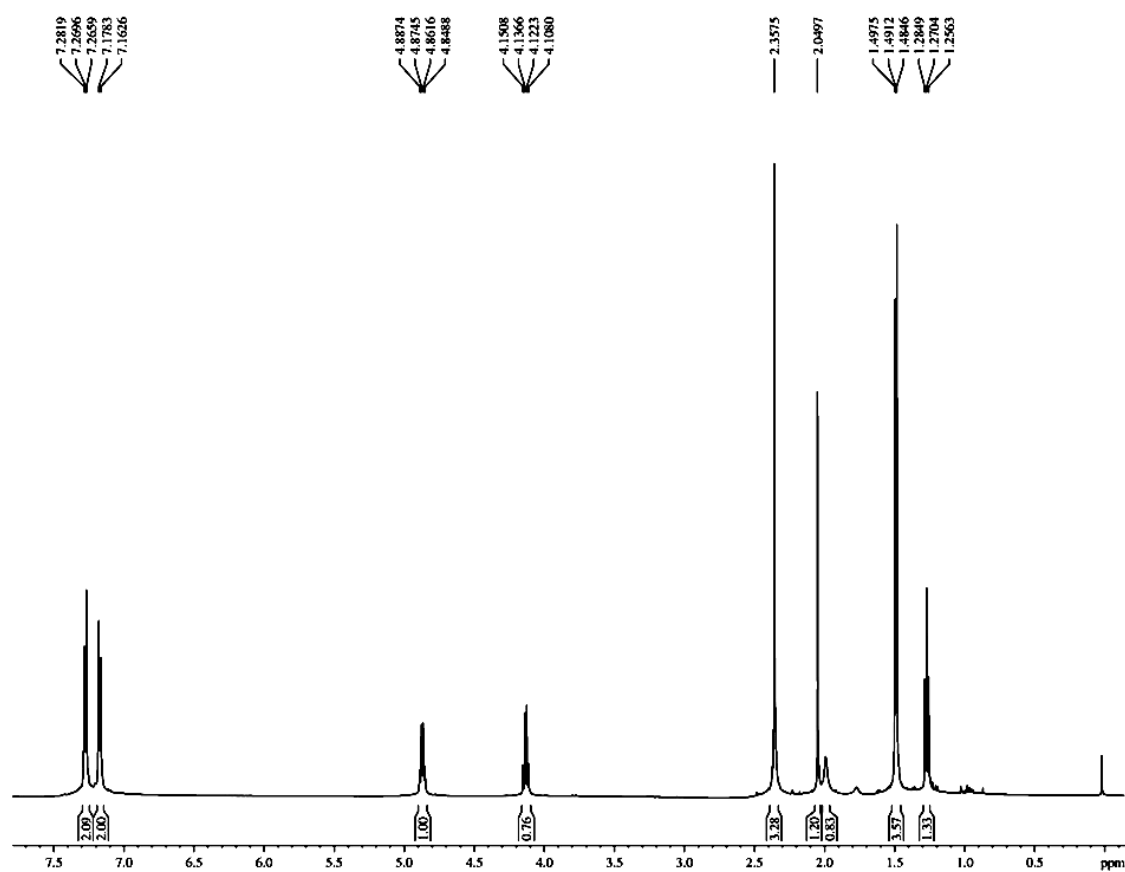
ANEXO 2

Espectro de RMN ^1H (300 Hz, CDCl_3) do (\pm) 1-(4-metóxi-fenil)-etanolCromatograma obtido por CLAE 4-metóxi-acetofenona (**2a**)

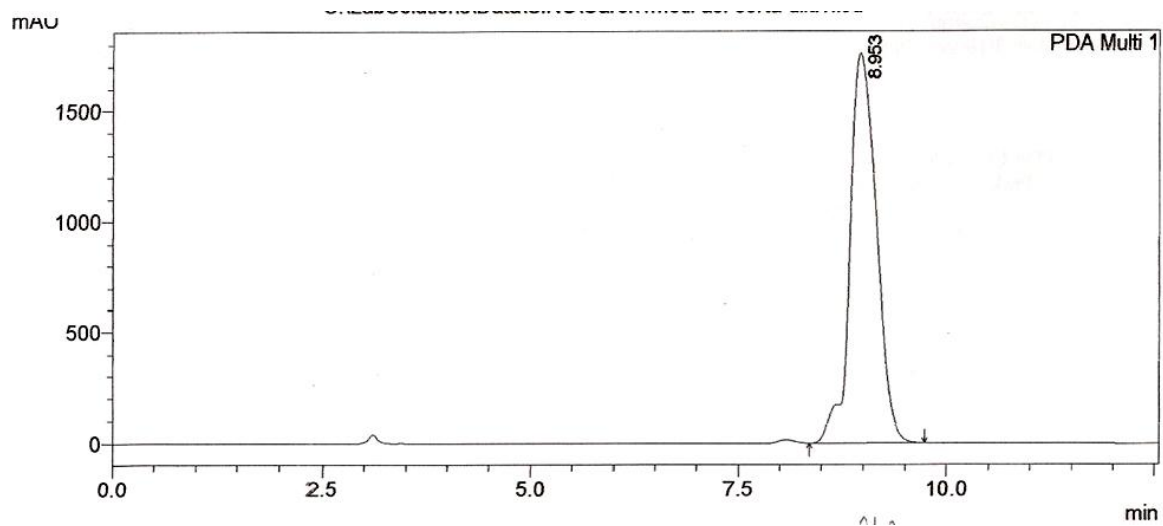


Cromatograma obtido por CLAE 1-(4-metóxfenil)-etanol (**2b**) t_R 9,3 (*S*) /11,9 (*R*)

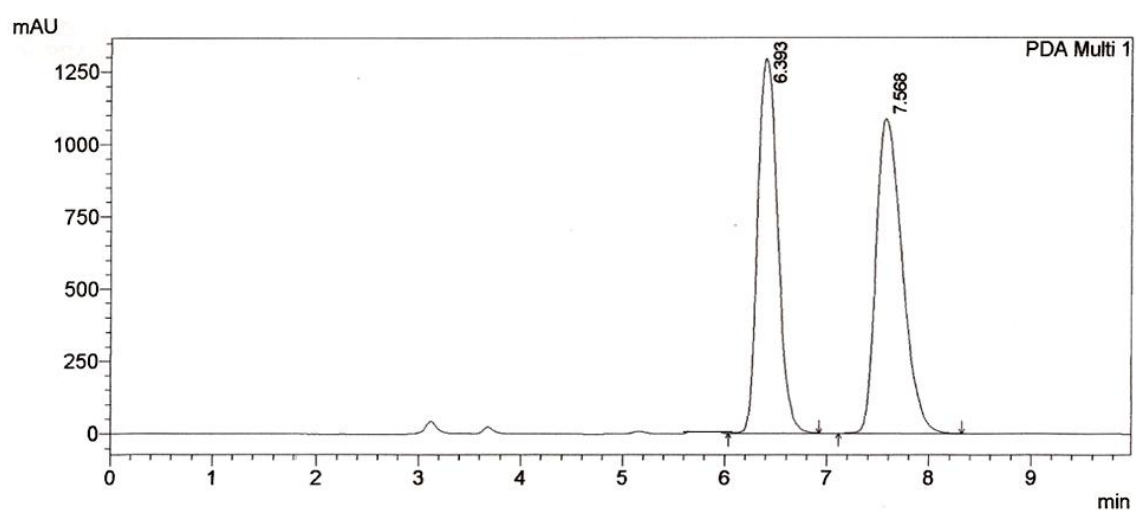
ANEXO 3



Espectro de RMN de ^1H (500 Hz, CDCl_3) do(\pm)-1-(4-metilfenil)-etanol (**3a**)

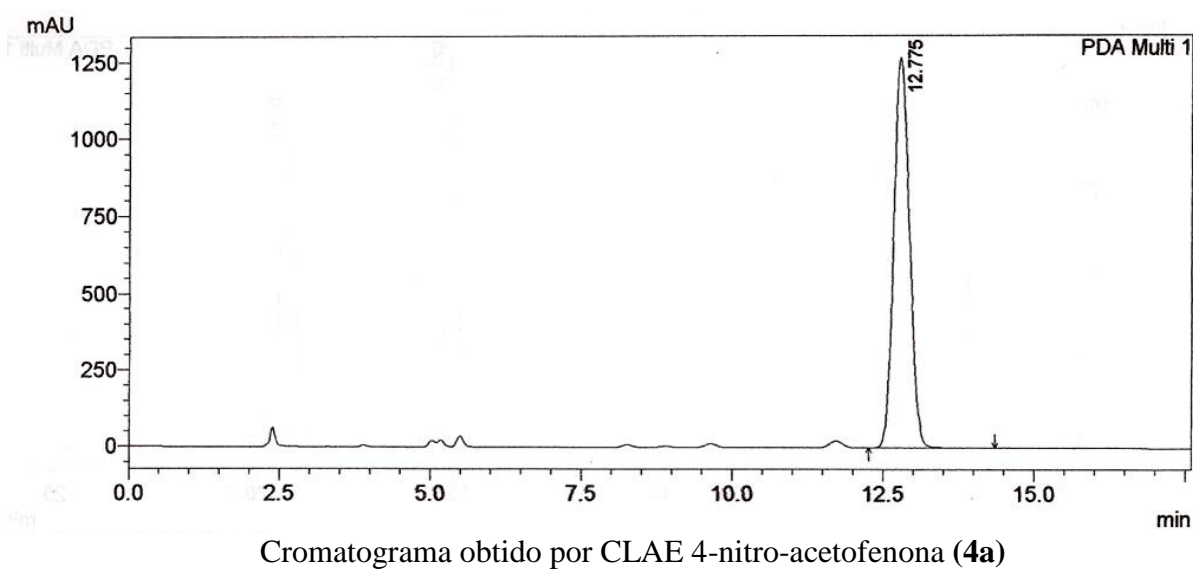
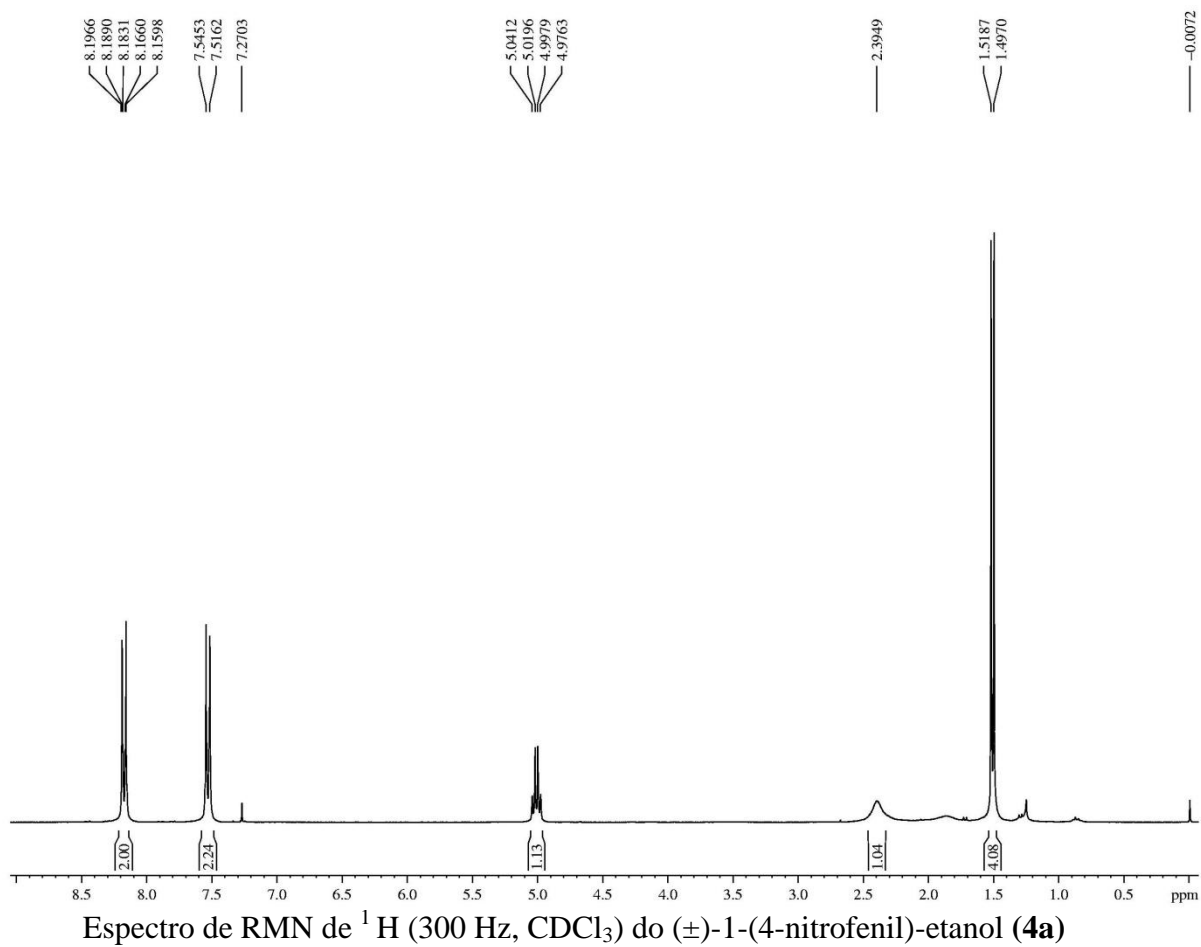


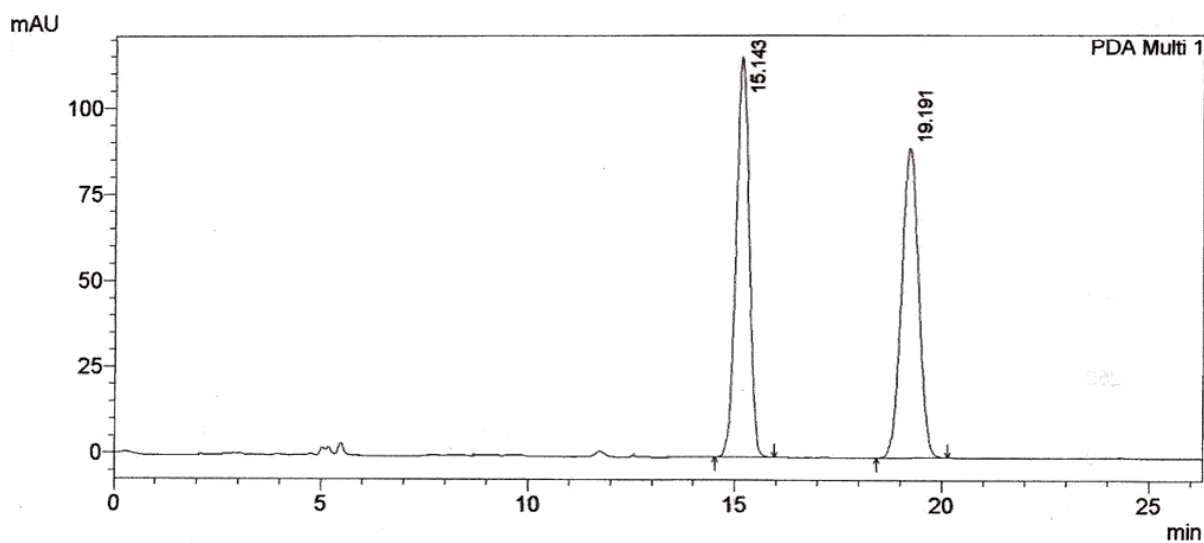
Cromatograma obtido por CLAE do 4-metil-acetofenona (**3a**)



Cromatograma obtido por CLAE do (\pm)-1-(4-metilfenil)-etanol (**3b**) t_R 6,3 (*S*) / 7,5 (*R*)

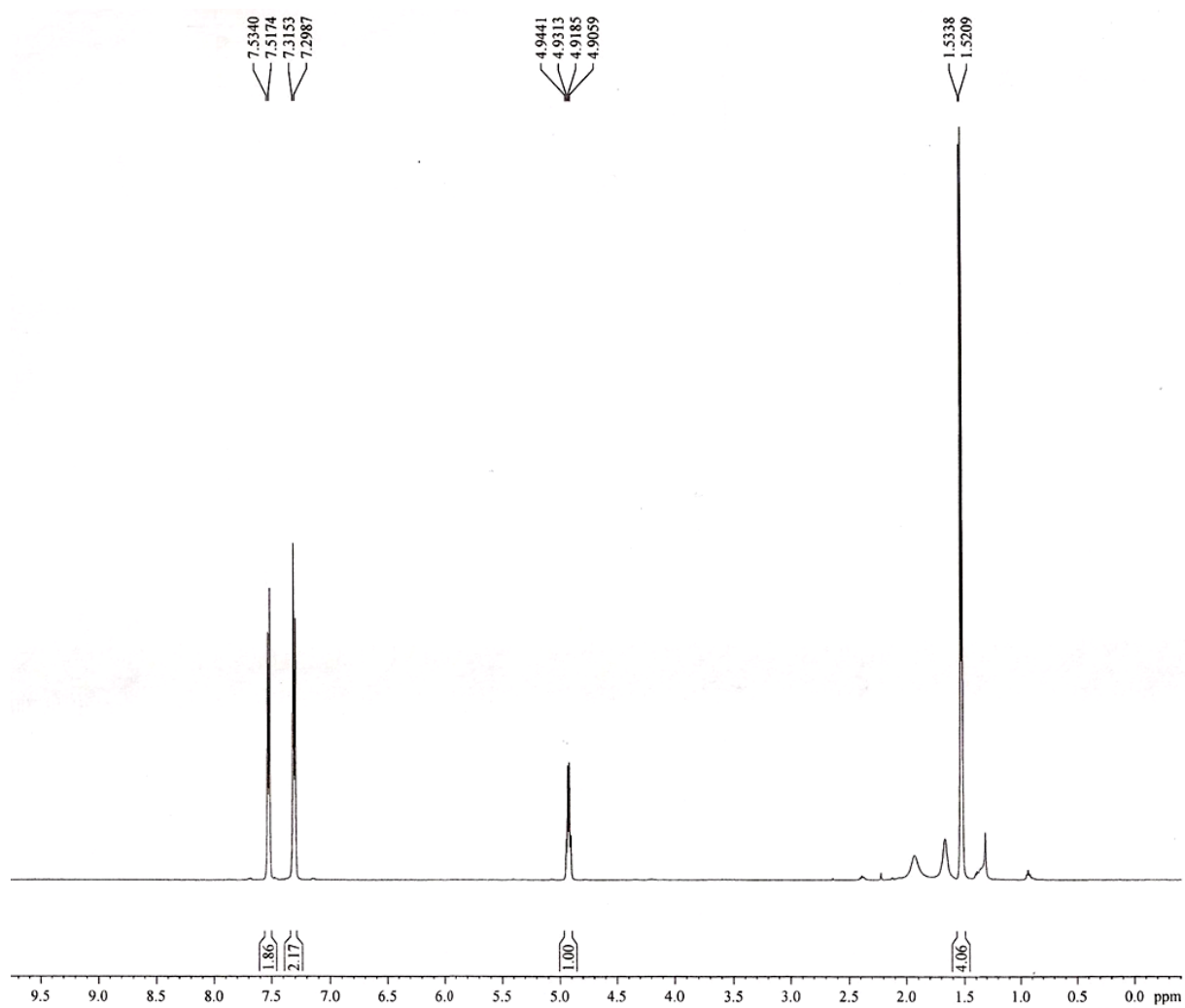
ANEXO 4



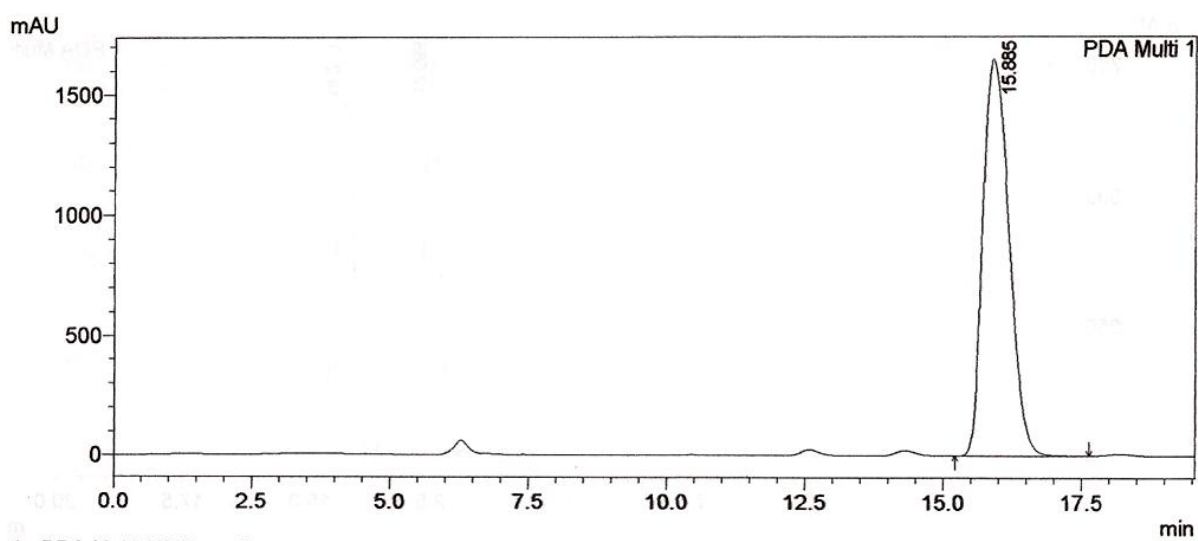


Cromatograma obtido por CLAE (\pm)1-(4-nitrofenil)-etanol (**4b**) t_R 15,1 (S) / 19,1 (R)

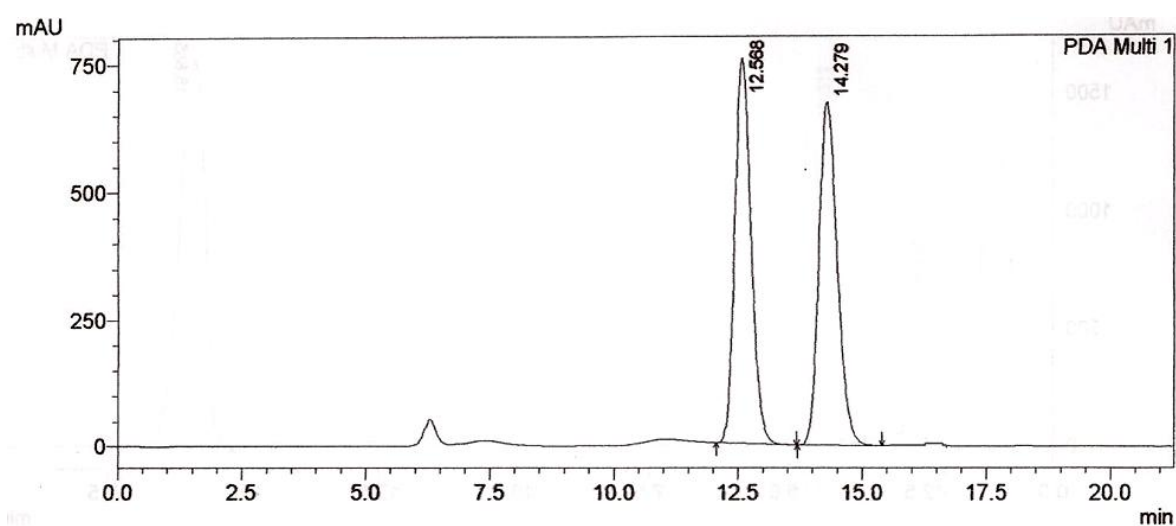
ANEXO 5



Espectro de RMN de ^1H (500 Hz, CDCl_3) do (\pm)-1-(4-bromofenil)-etanol (**5a**)

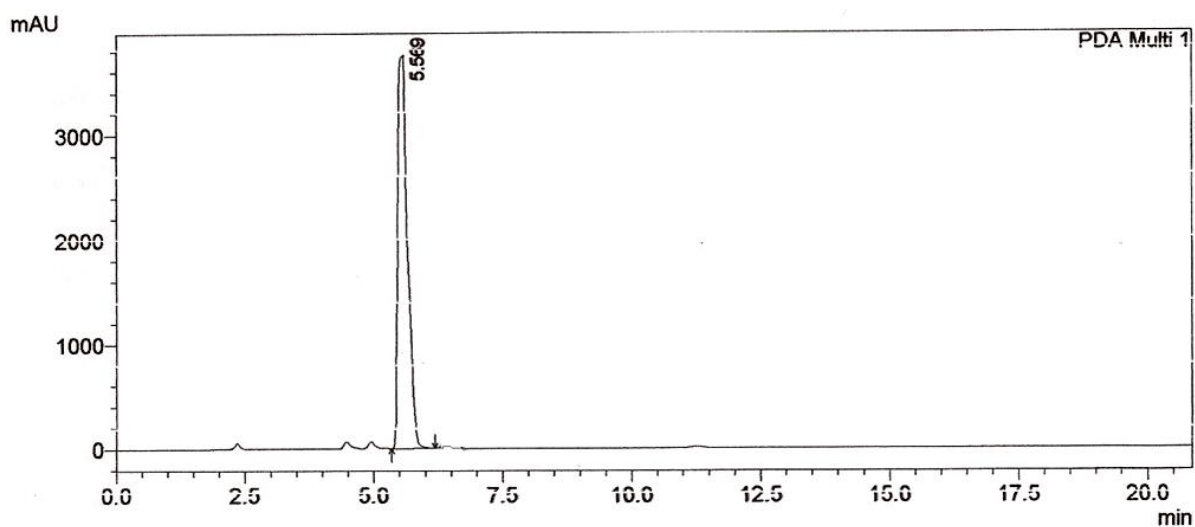
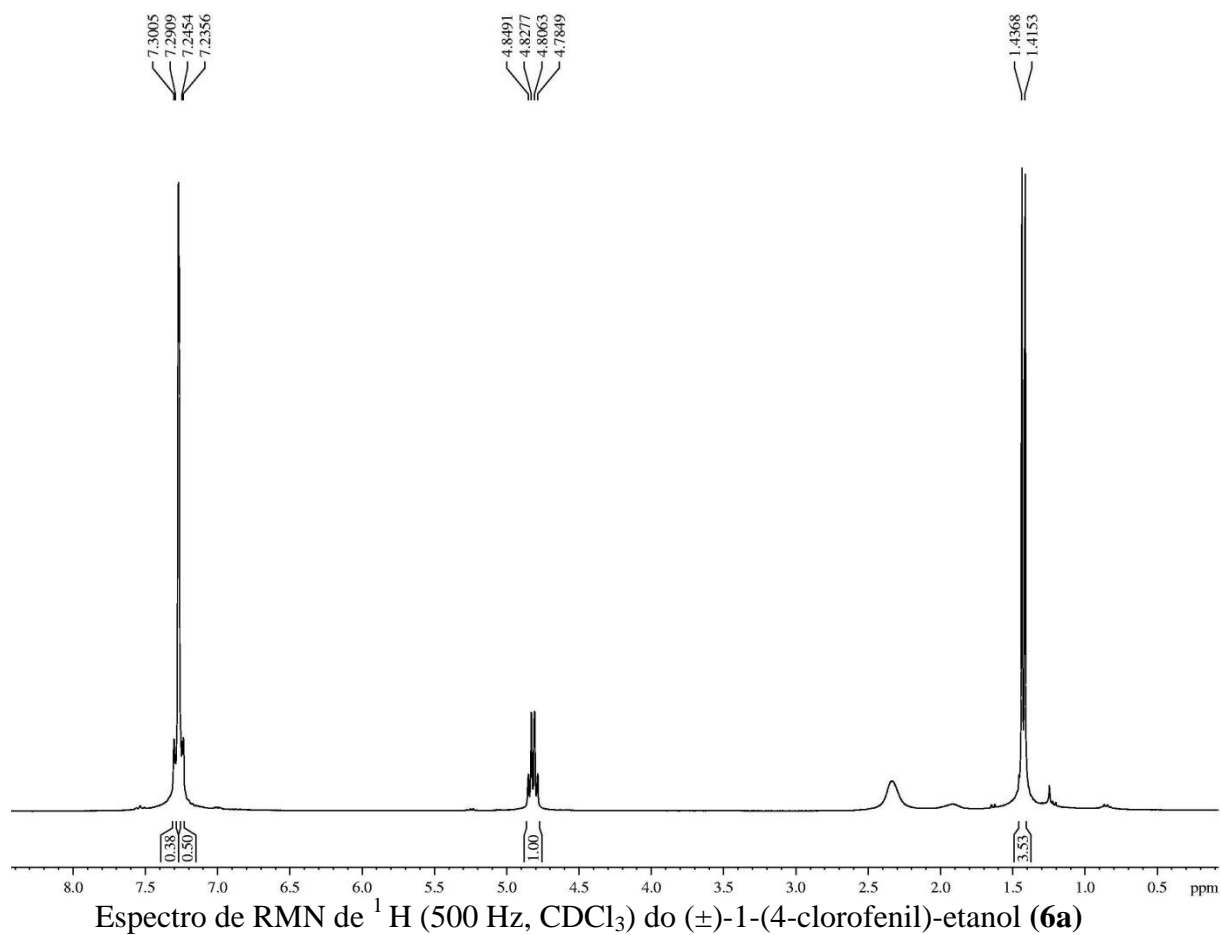


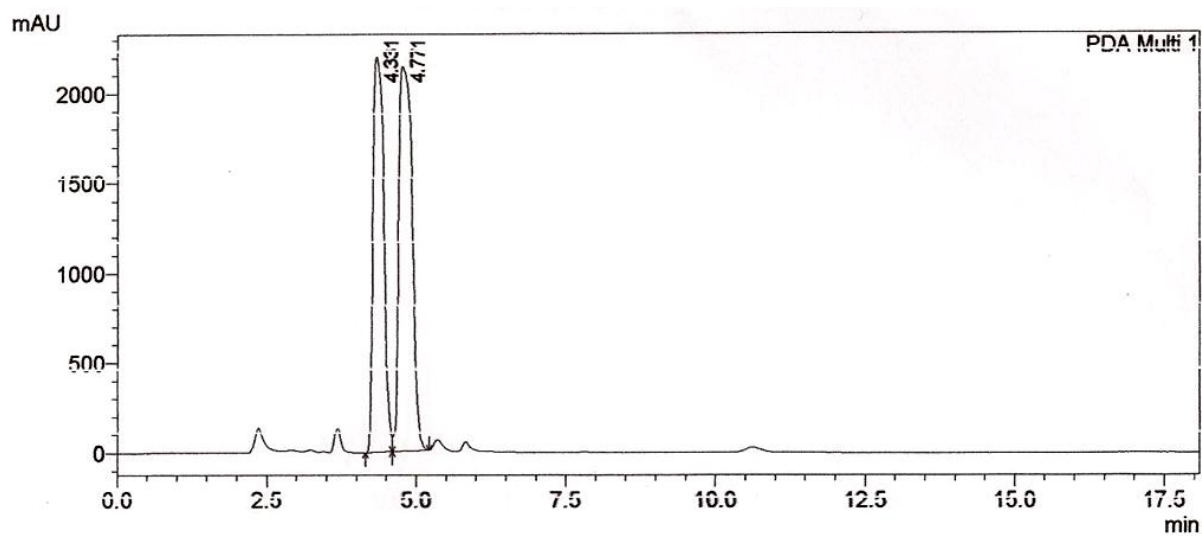
Cromatograma obtido por CLAE 4-bromo-acetofenona (**5a**)



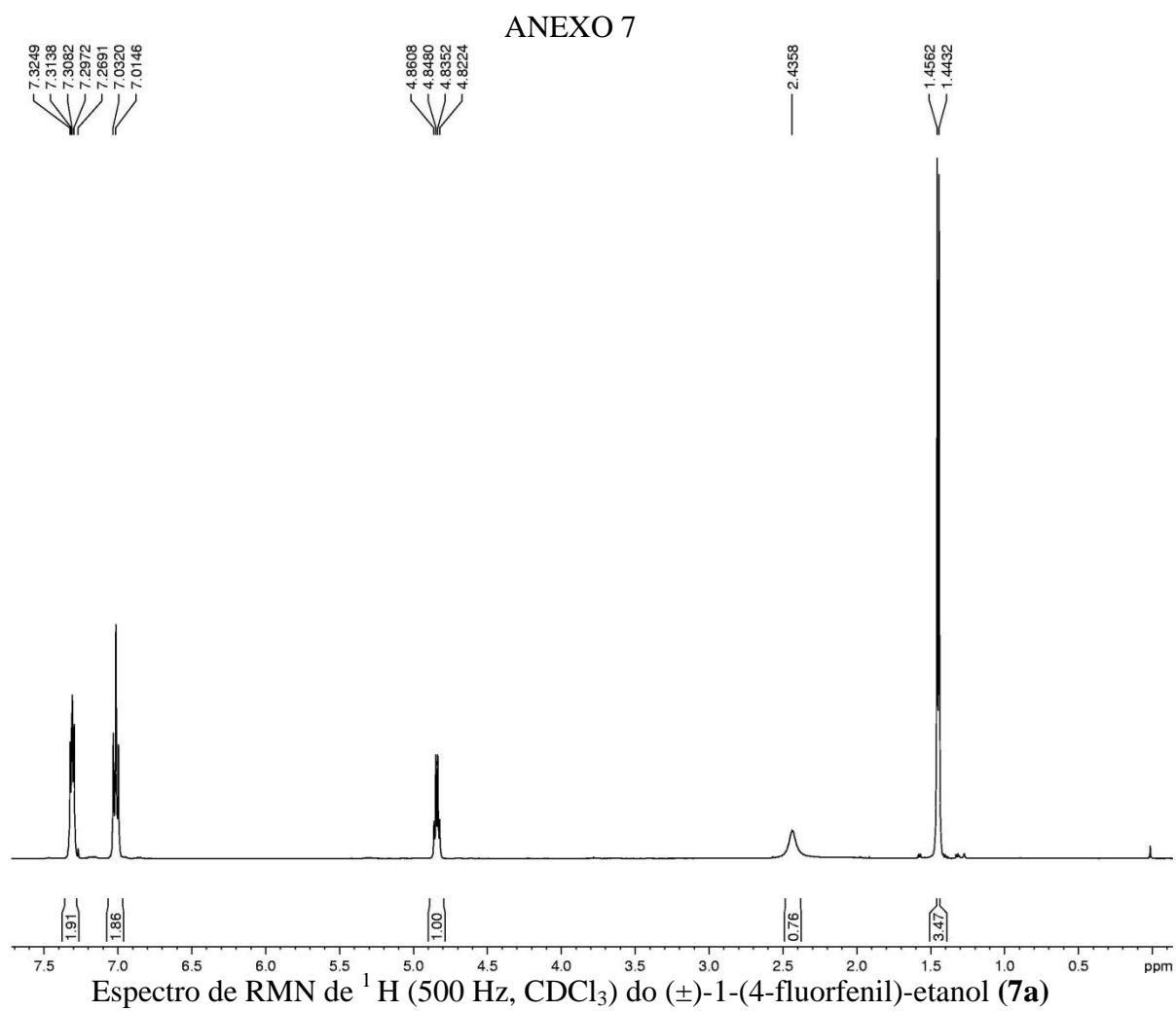
Cromatograma obtido por CLAE (\pm)-1-(4-bromofenil)-etanol (**5b**) t_R 12,5 (S) / 14,2 (R)

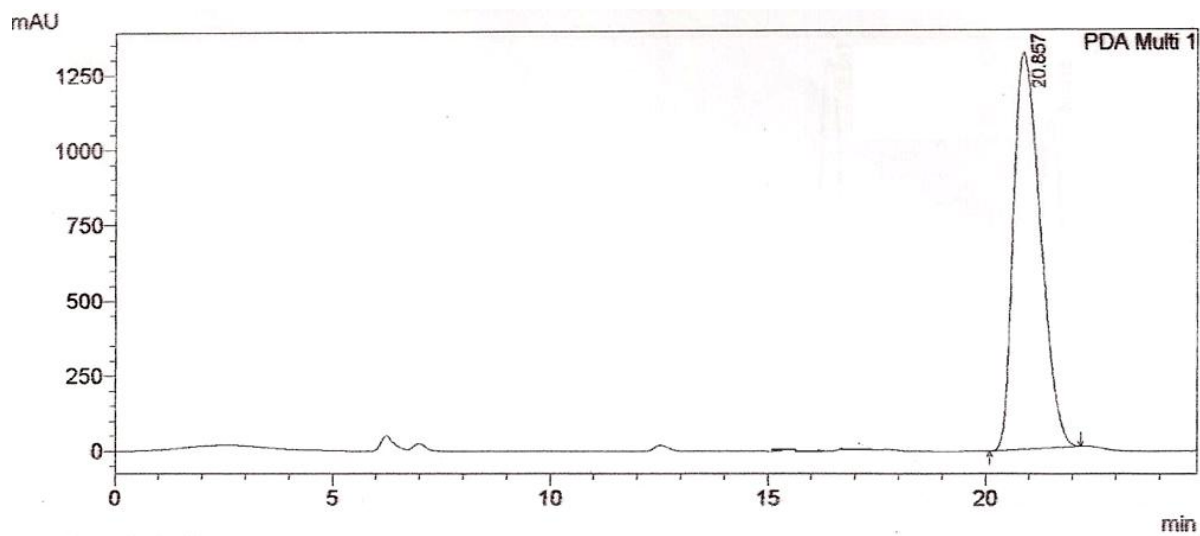
ANEXO 6

Cromatograma obtido por CLAE 4-cloro-acetofenona (**6a**)

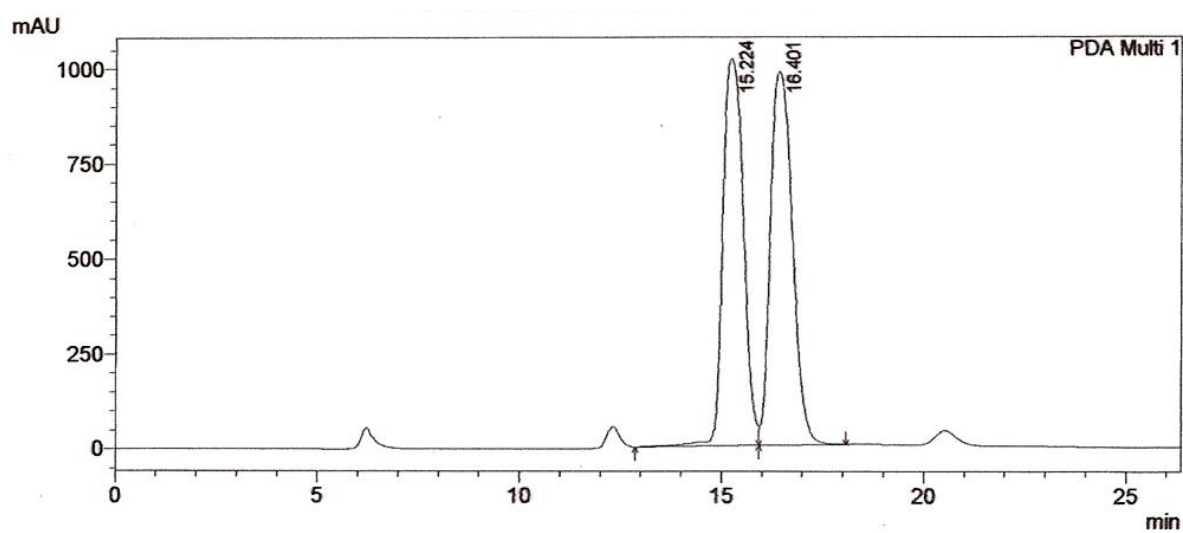


Cromatograma obtido por CLAE (\pm)-1-(4-clorofenil)-etanol (**6b**) t_R 4,3 (*S*) / 4,7(*R*)



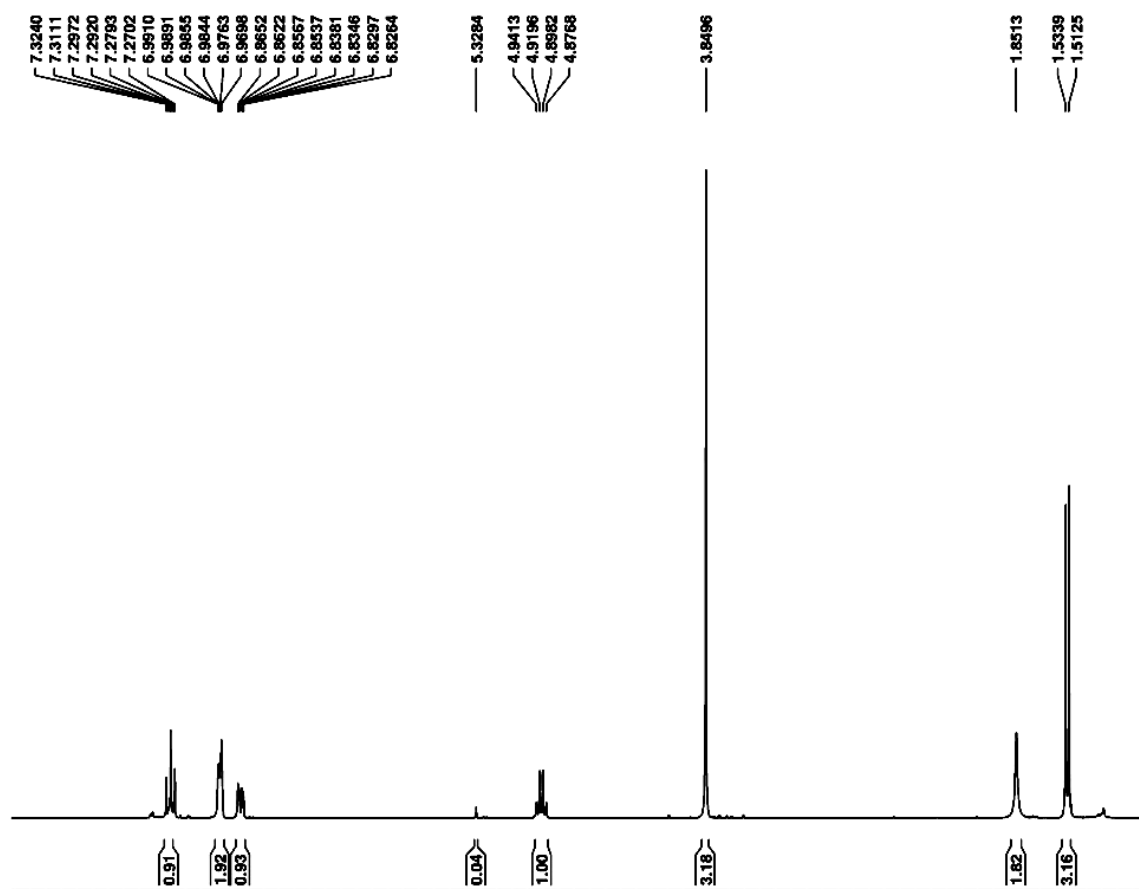


Cromatograma obtido por CLAE 4-fluoro-acetofenona (**7a**)

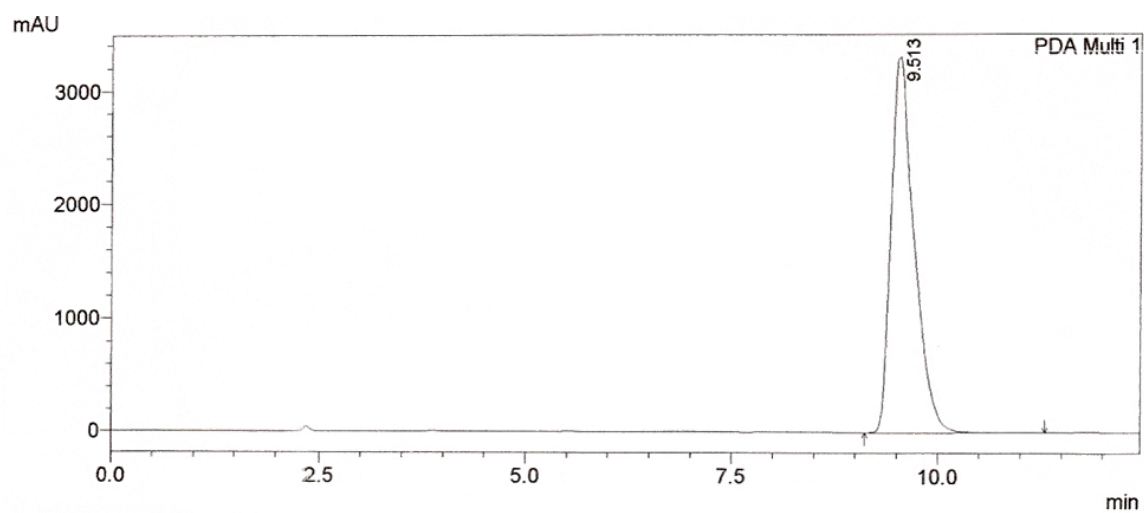


Cromatograma obtido por CLAE (±)-1-(4-fluorofenil)-etanol(**7b**) t_R 15,2 (S) / 16,4 (R)

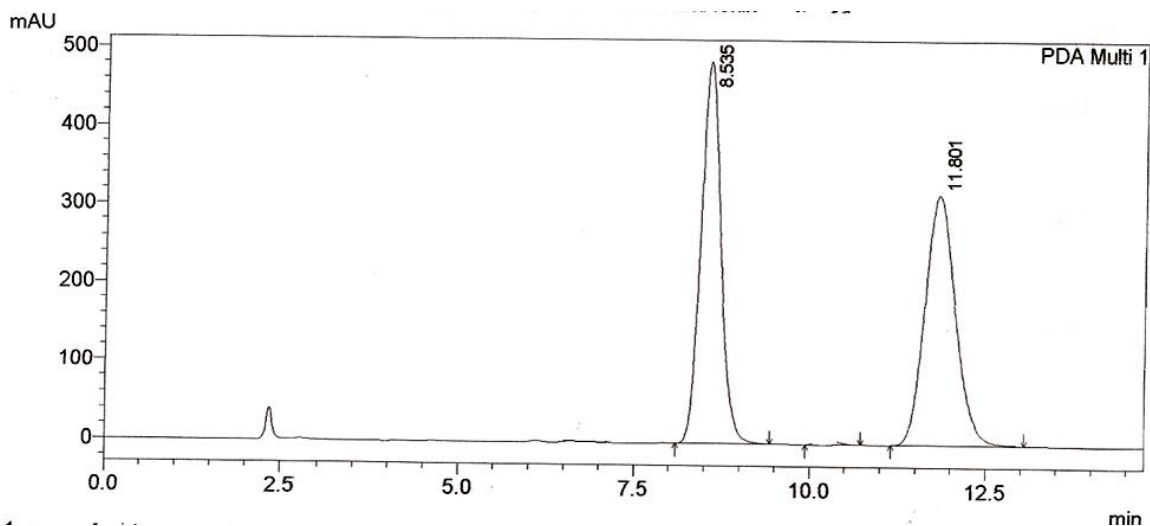
ANEXO 8



Espectro de RMN de ^1H (300Hz, CDCl_3) do (\pm) 1-(3-metóxi)fenil)etanol (**8b**).

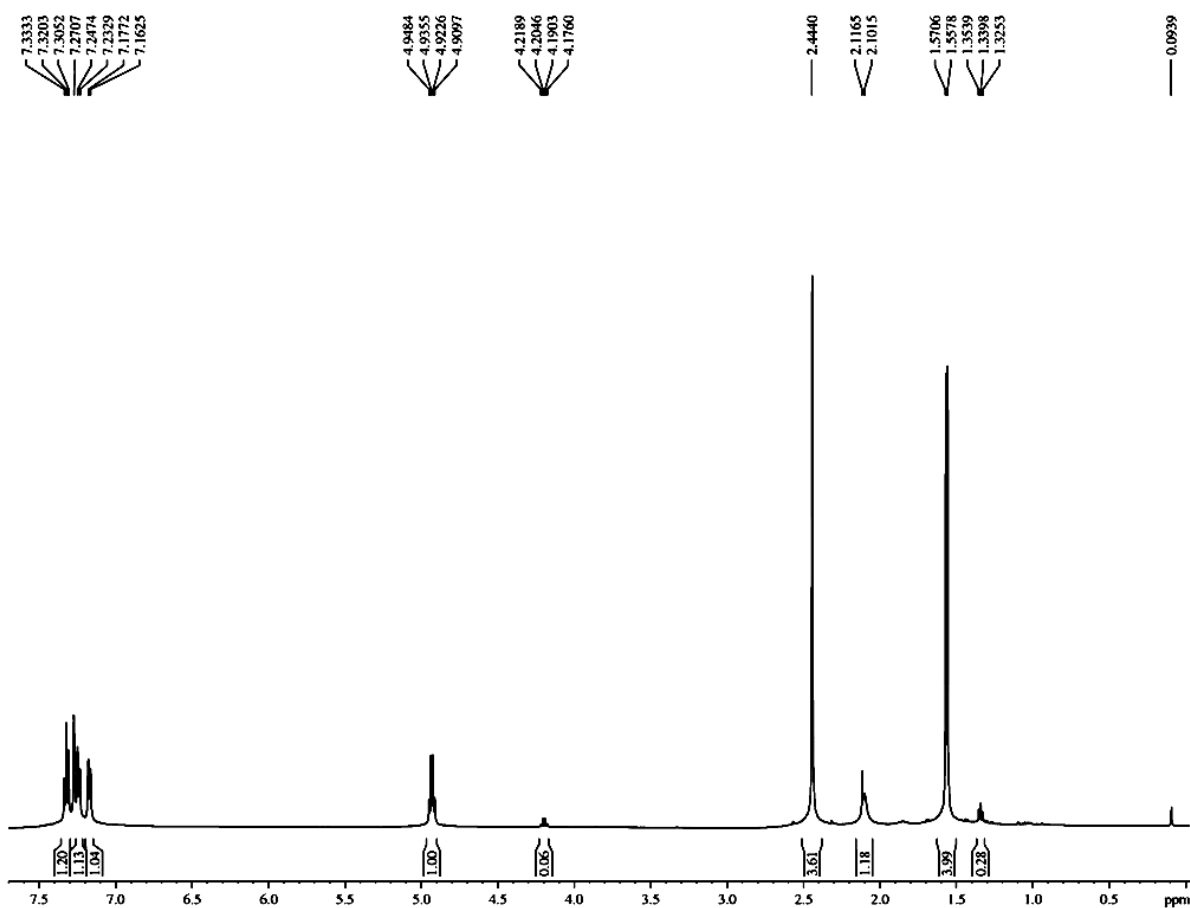


Cromatograma obtido por CLAE do 3-metóxi-acetofenona (**8a**)

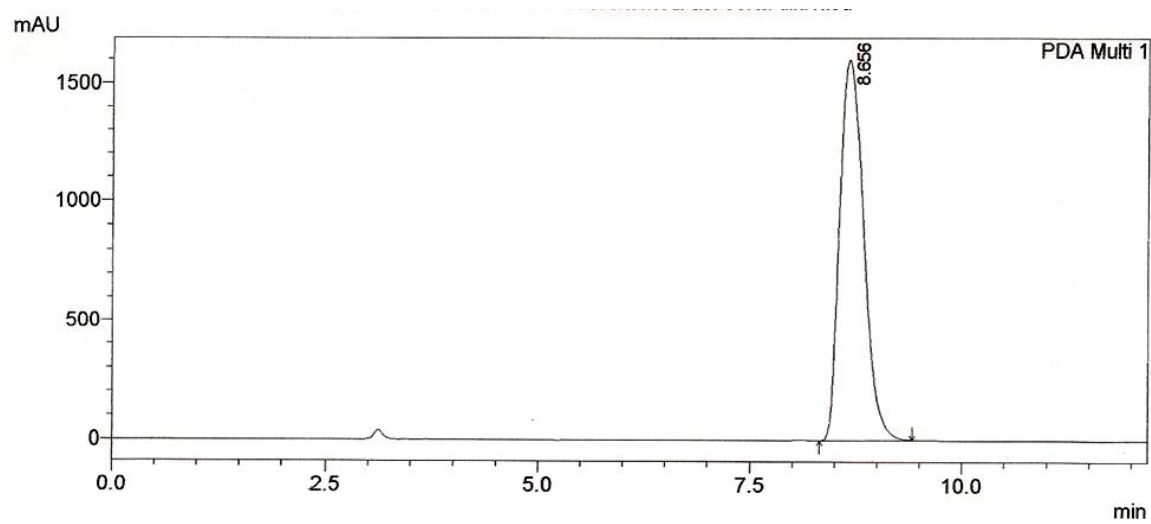


Cromatograma obtido por CLAE do (\pm)1-(3-metóxfenil)-etanol (**8b**) t_R 8,5(*S*) t_R 11,8 (*R*)

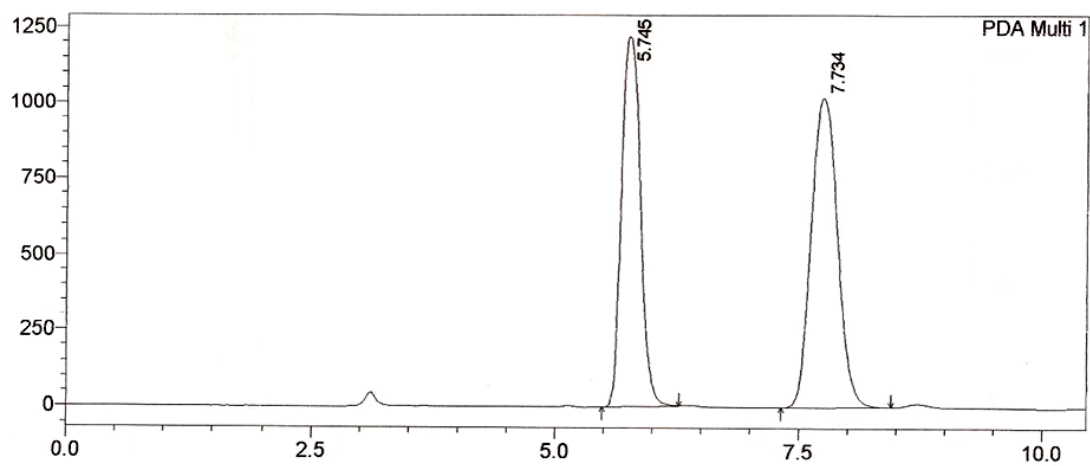
ANEXO 9



Espectro de RMN de ^1H (500 Hz, CDCl_3) do (\pm)1-(3-metilfenil)-etanol (**9b**)

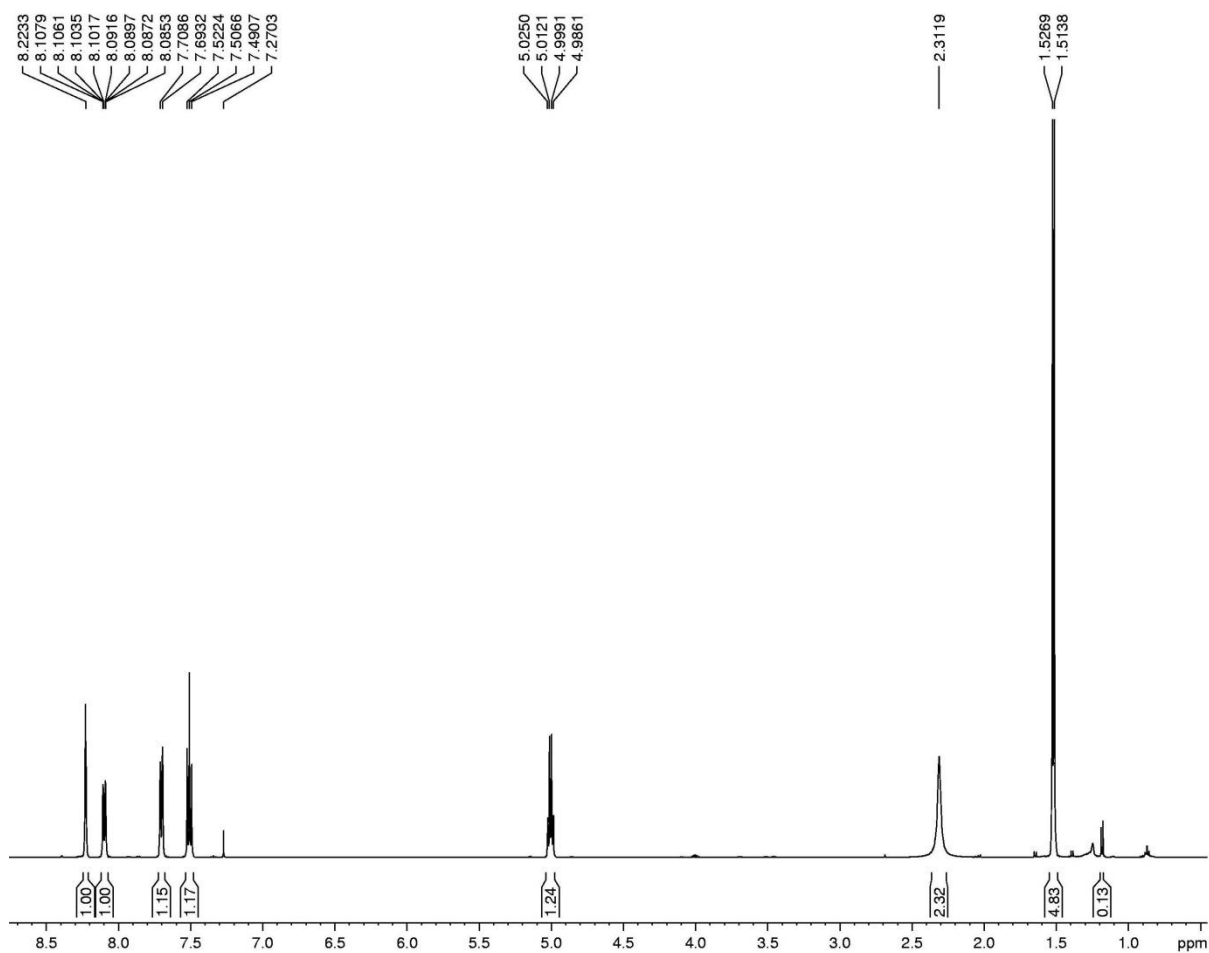
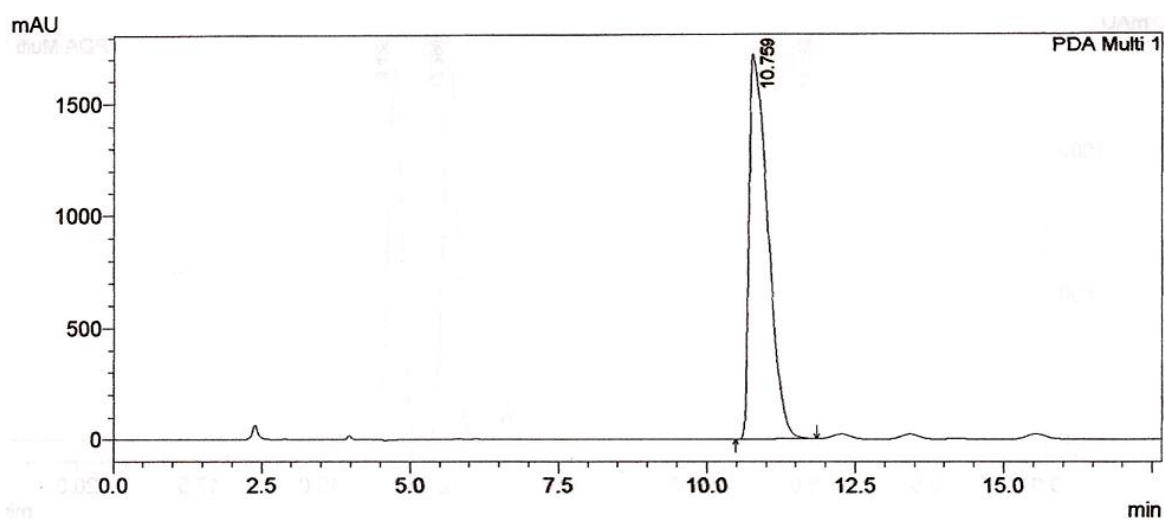


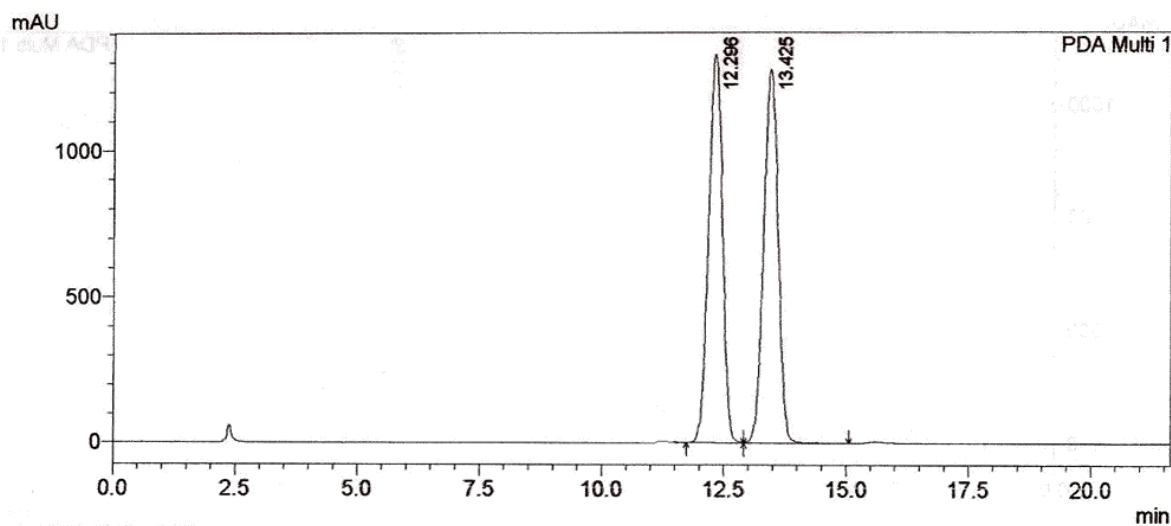
Cromatograma obtido por CLAE do 3-metil-acetofenona (**9a**)



Cromatograma obtido por CLAE do (\pm)-1-(3-metilfenil)-etanol (**9b**) t_R 5,7(S) / 7,7 (R)

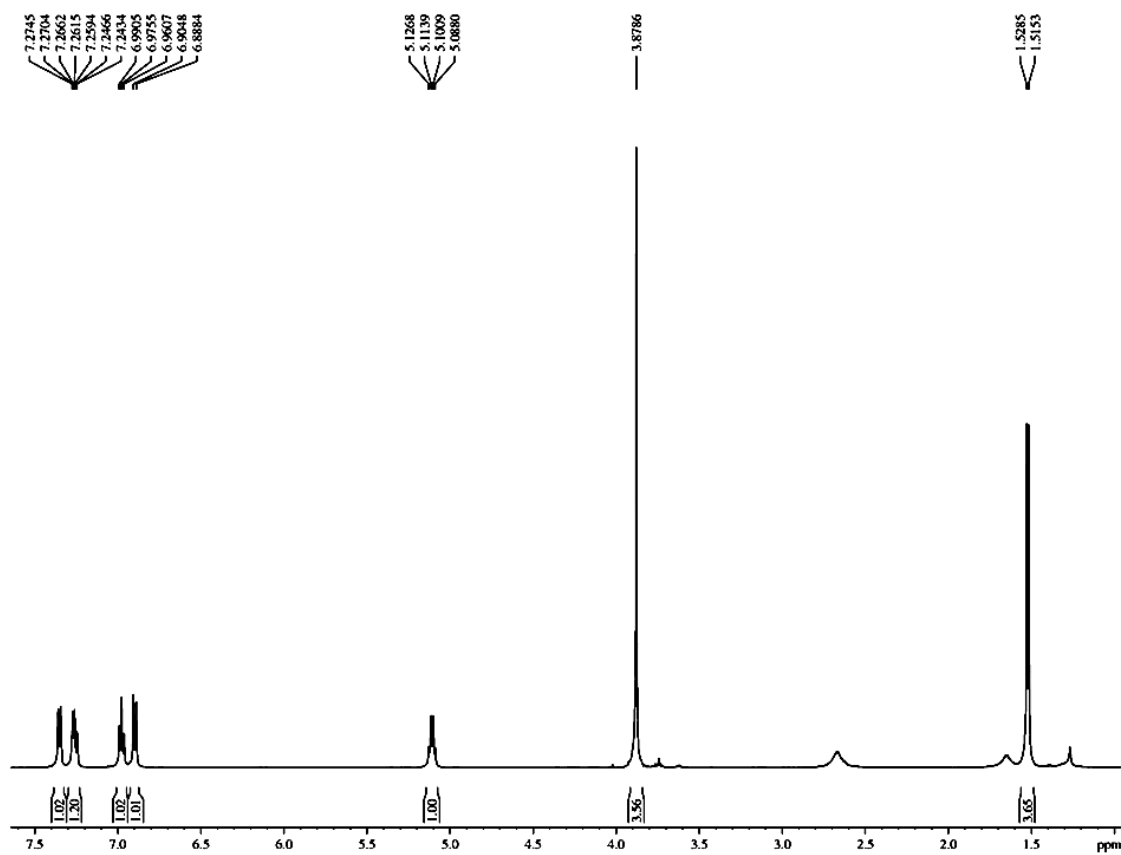
ANEXO 10

Espectro de RMN de ¹H (500 Hz, CDCl₃) do (±)-1-(3-nitrofenil)-etanol (**10b**)Cromatograma obtido por CLAE 3-nitro-acetofenona (**10a**).

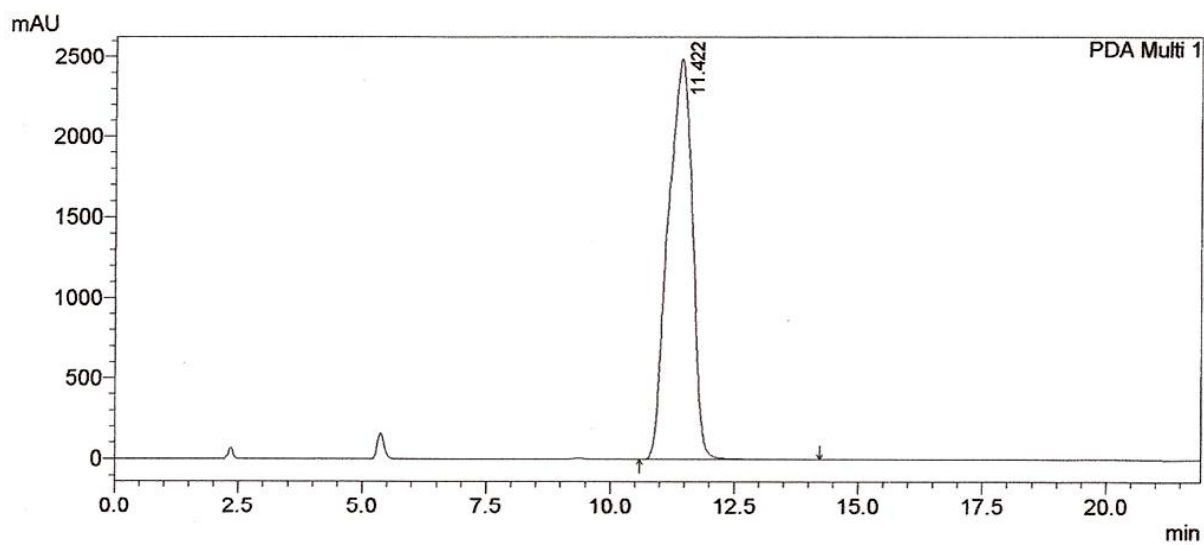


Cromatograma obtido por CLAE (\pm)1-(3-nitrofenil)-etanol (**10b**) 12,2(*S*) / 13,4(*R*)

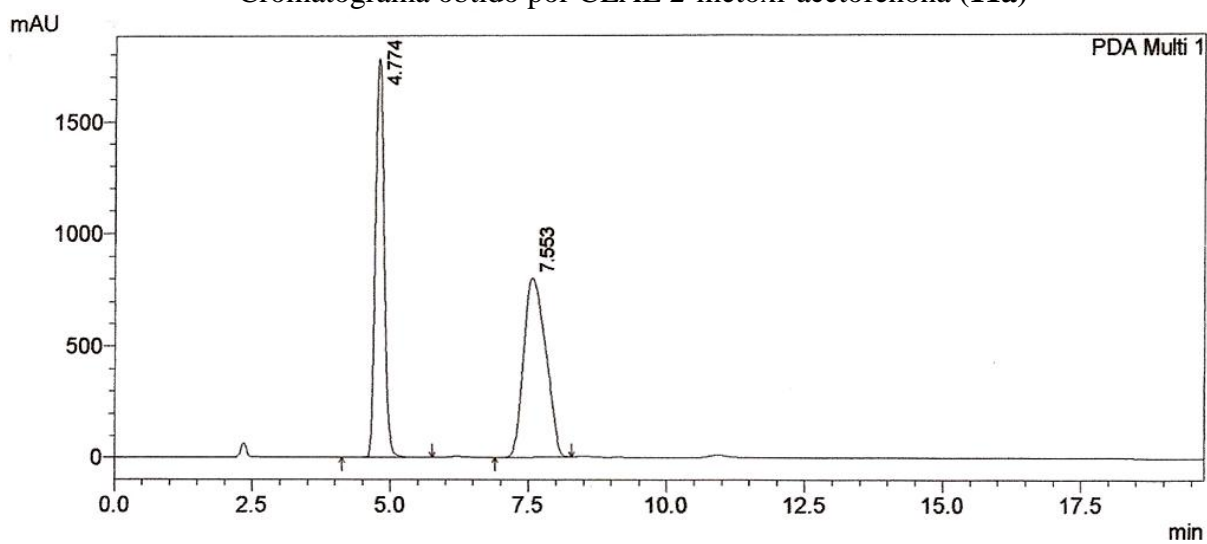
ANEXO 11



Espectro de RMN de ^1H (500 Hz, CDCl_3)(\pm) -1-(2-metóxi-fenil)-etanol (**11b**)

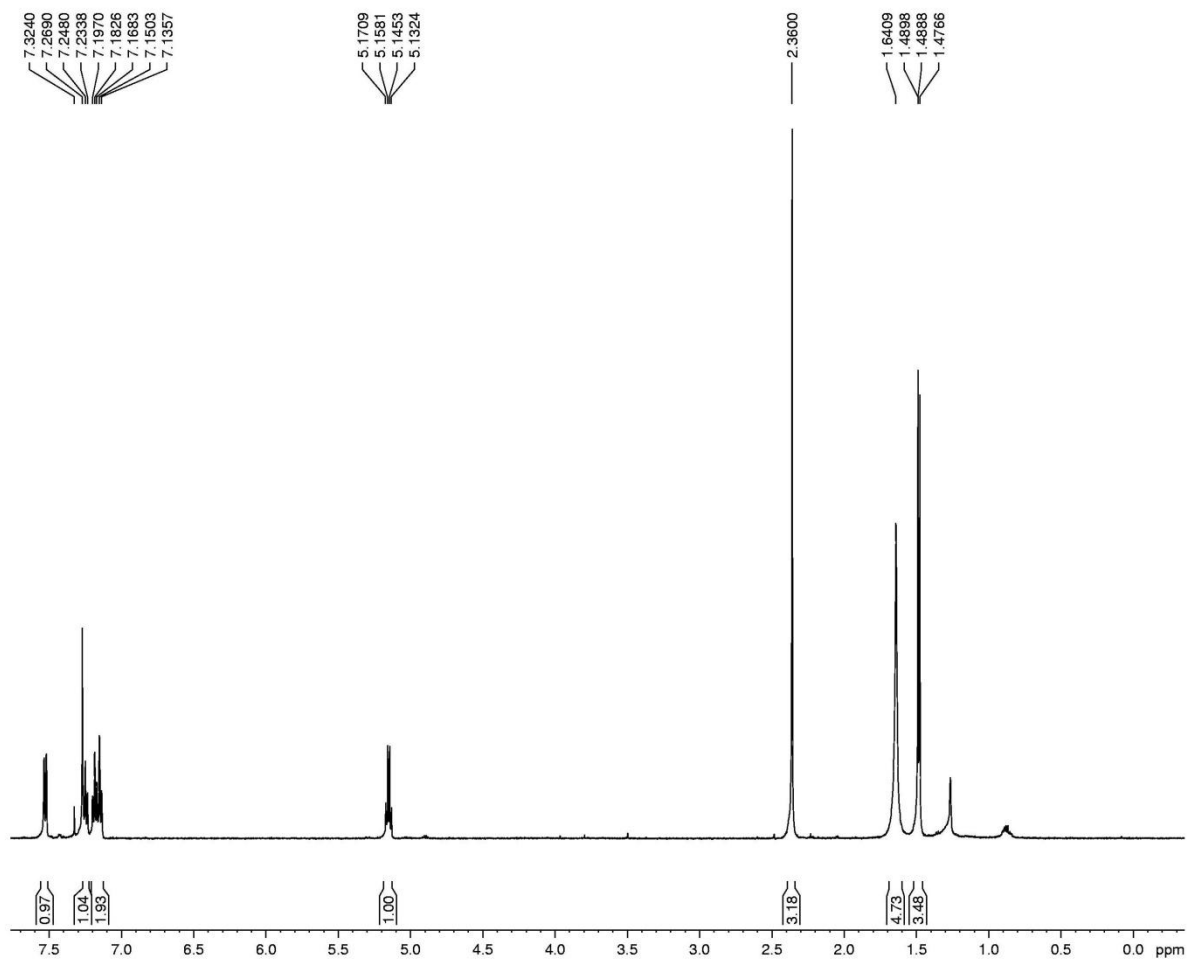
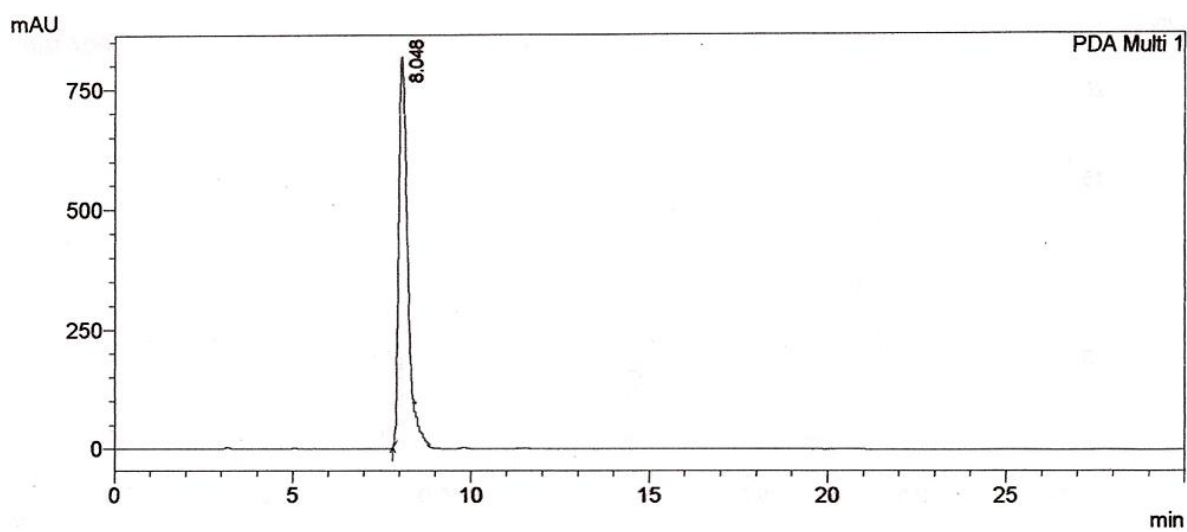


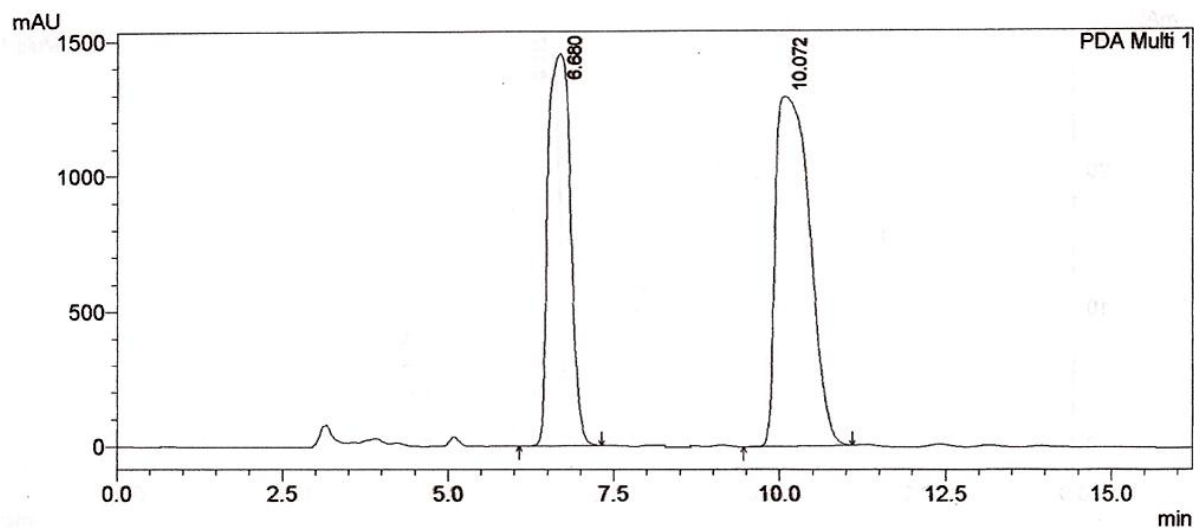
Cromatograma obtido por CLAE 2-metóxi-acetofenona (**11a**)



Cromatograma obtido por CLAE do 1-(2-metóxi-fenil)-etanol (**11b**) t_R 4,7(S) e 7,5 t_R (R)

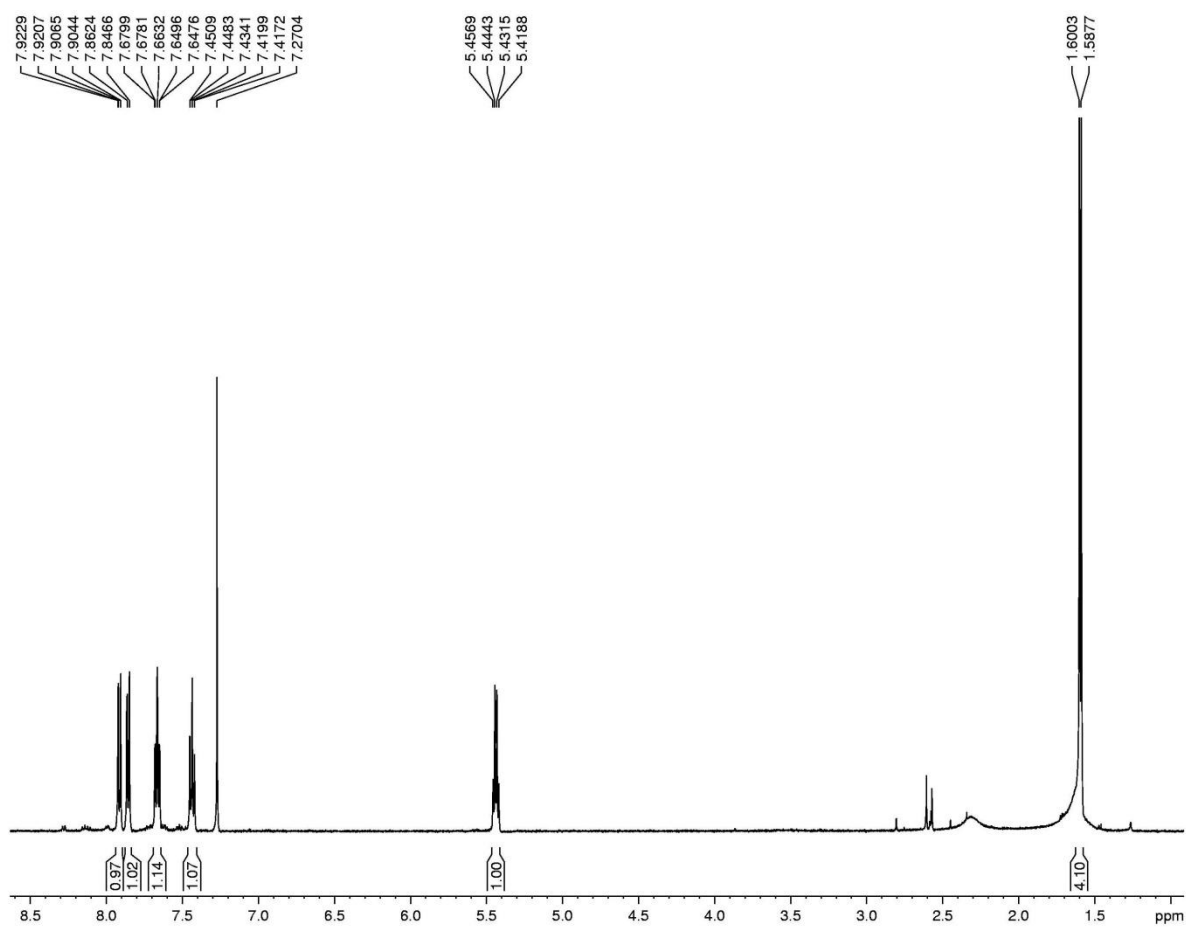
ANEXO 12

Espectro de RMN de ^1H (500 Hz, CDCl_3) do (±)- 1-(2-metilfenil)-etanol (**12b**)Cromatograma obtido por CLAE do 2-metilacetofenona (**12a**)

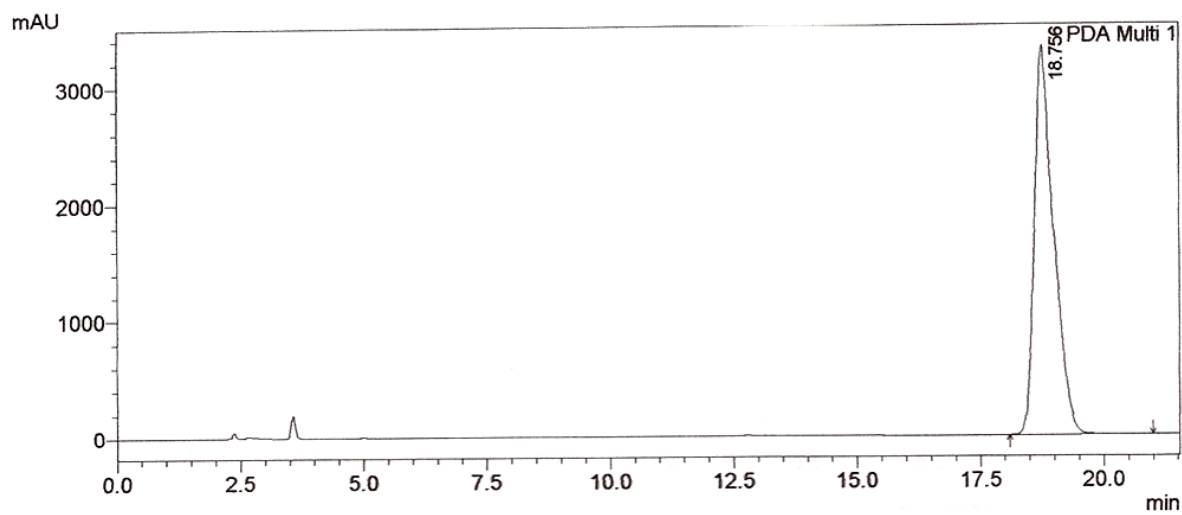


Cromatograma obtido por CLAE do 1-(2-metilfenil)-etanol (**12b**)) t_R 6,6 (S) / 10,07 (R)

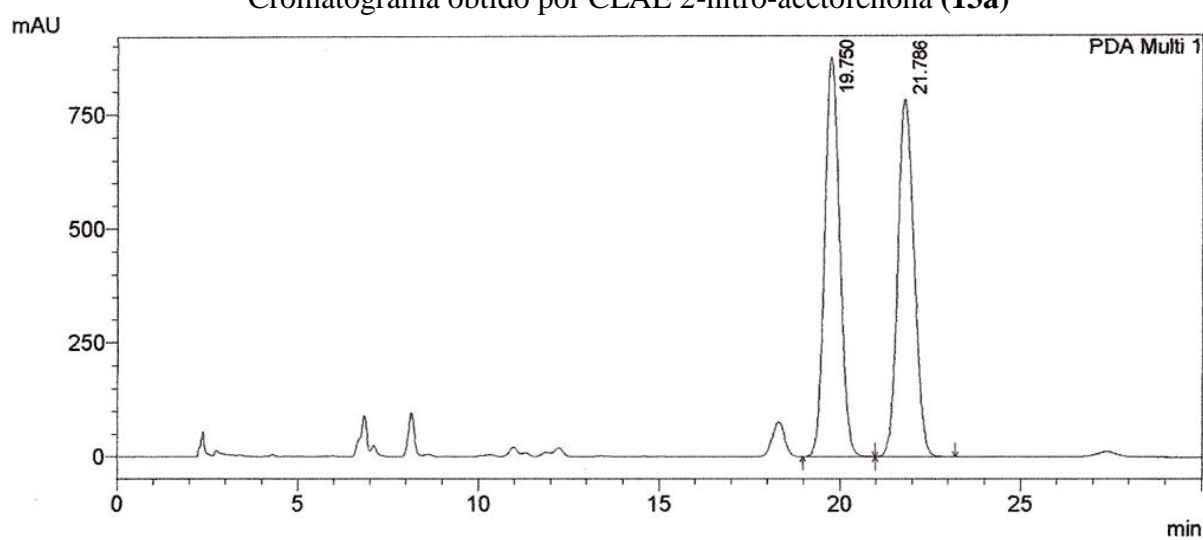
ANEXO 13



Espectro de RMN de ^1H (500 Hz, CDCl_3) do (\pm)-1-(2-nitrofenil)-etanol (**13b**)

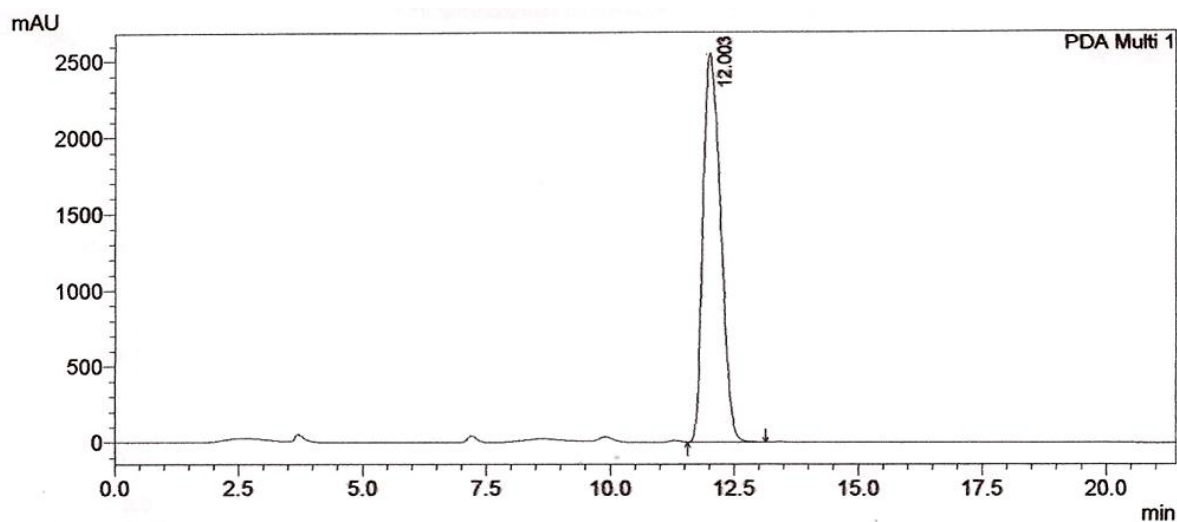
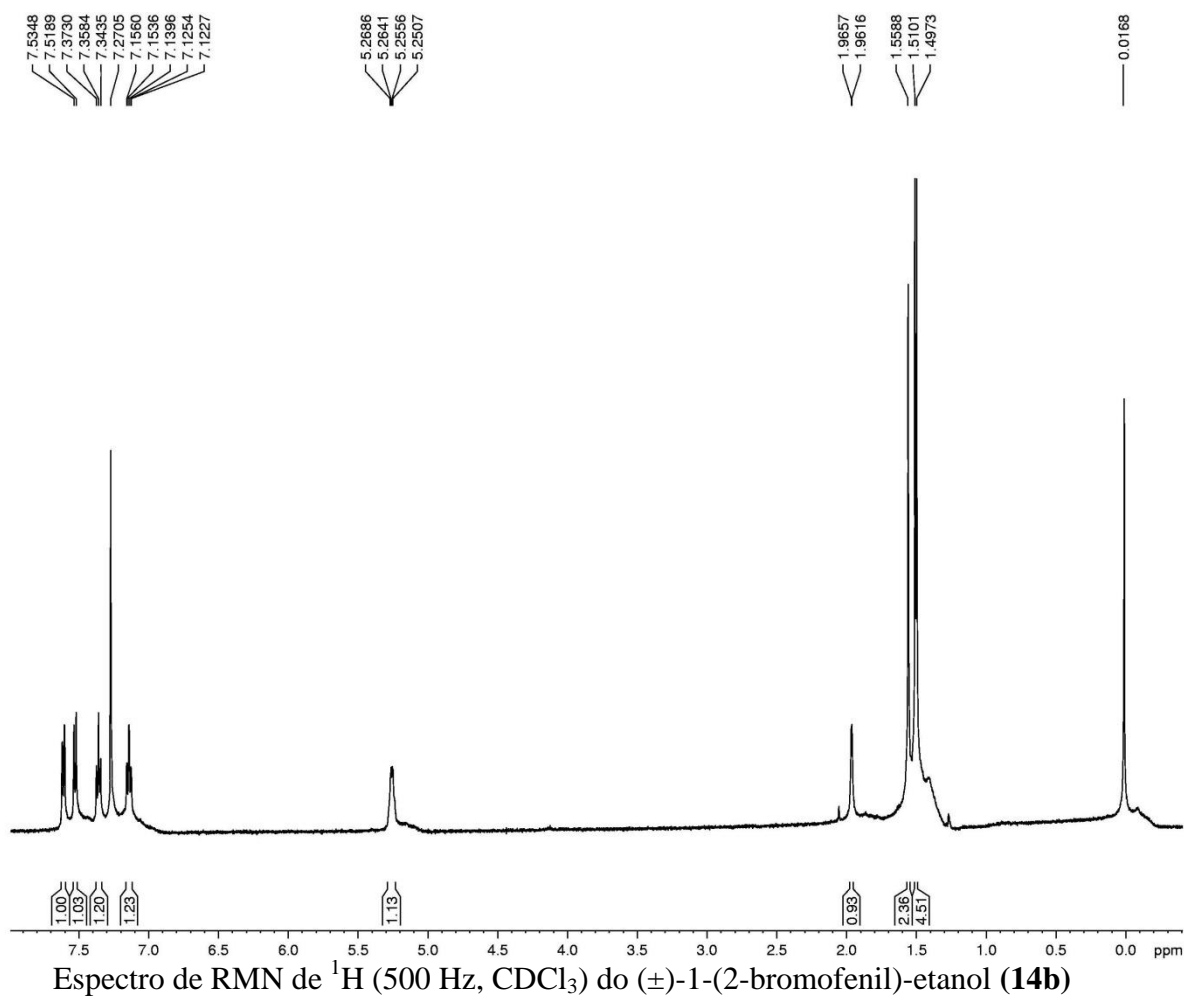


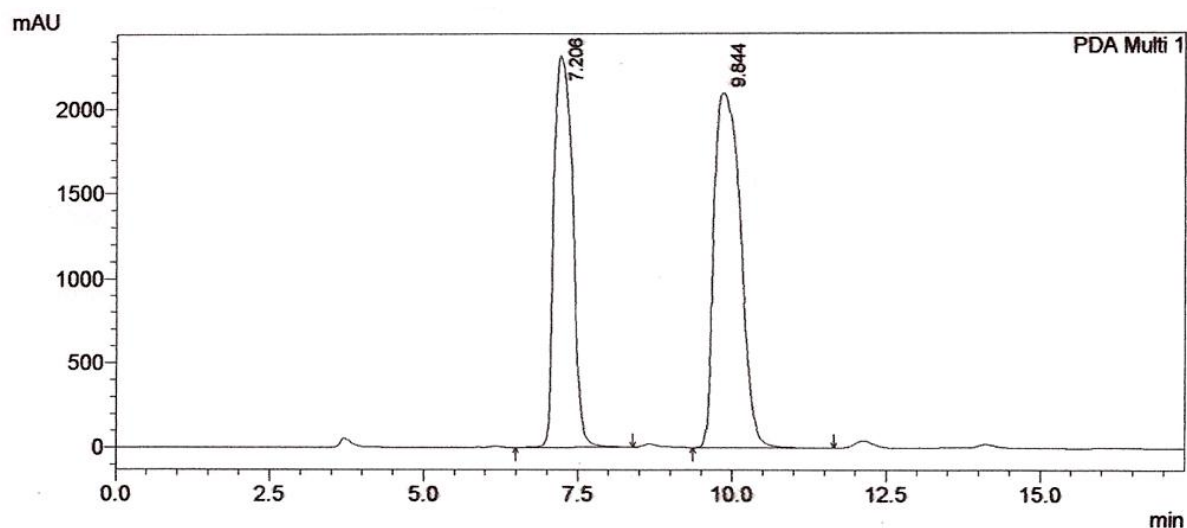
Cromatograma obtido por CLAE 2-nitro-acetofenona (**13a**)



Cromatograma obtido por CLAE (±)-1-(2-nitrofenil)-etanol (**13b**) t_R 19,5 (*S*) / 21,7 (*R*)

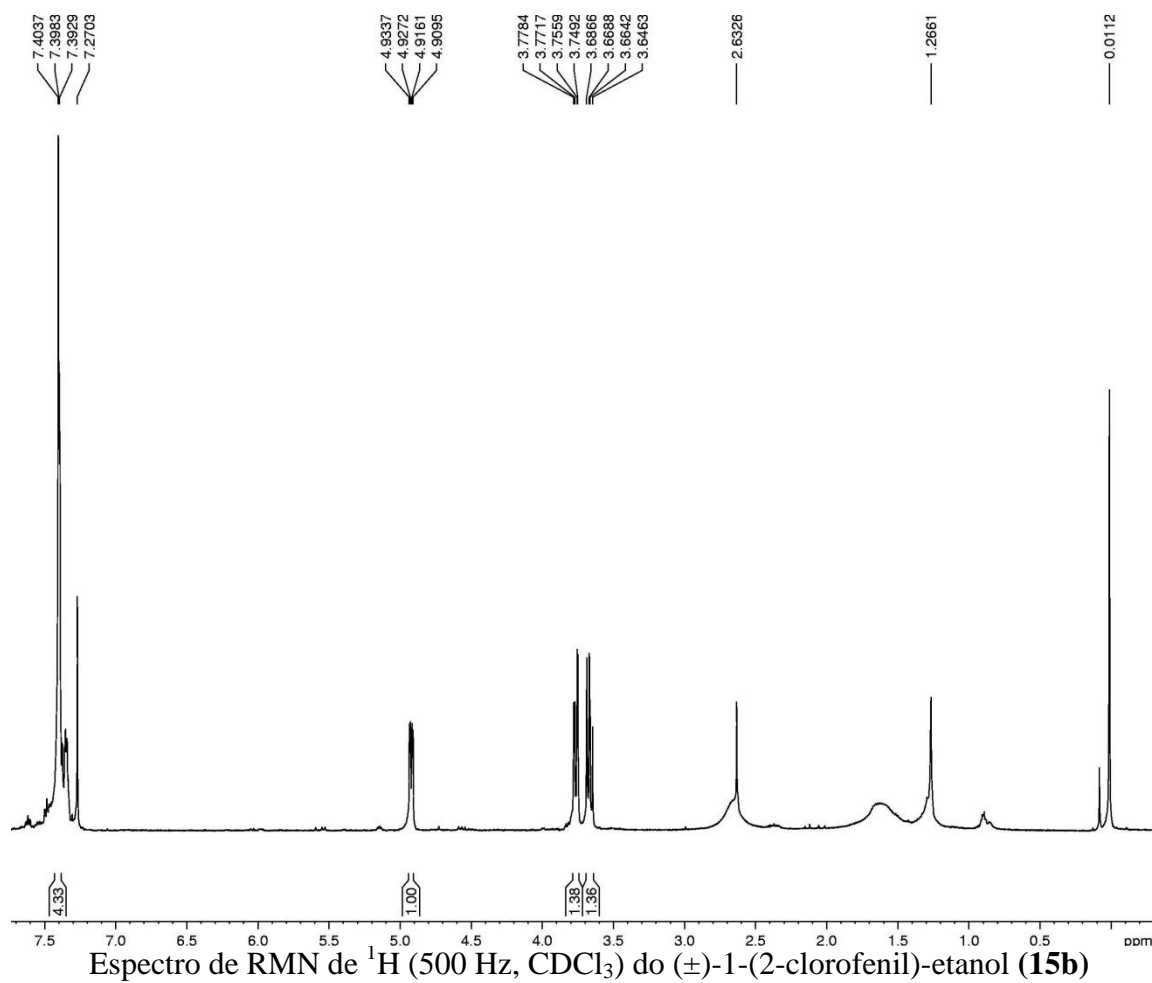
ANEXO 14



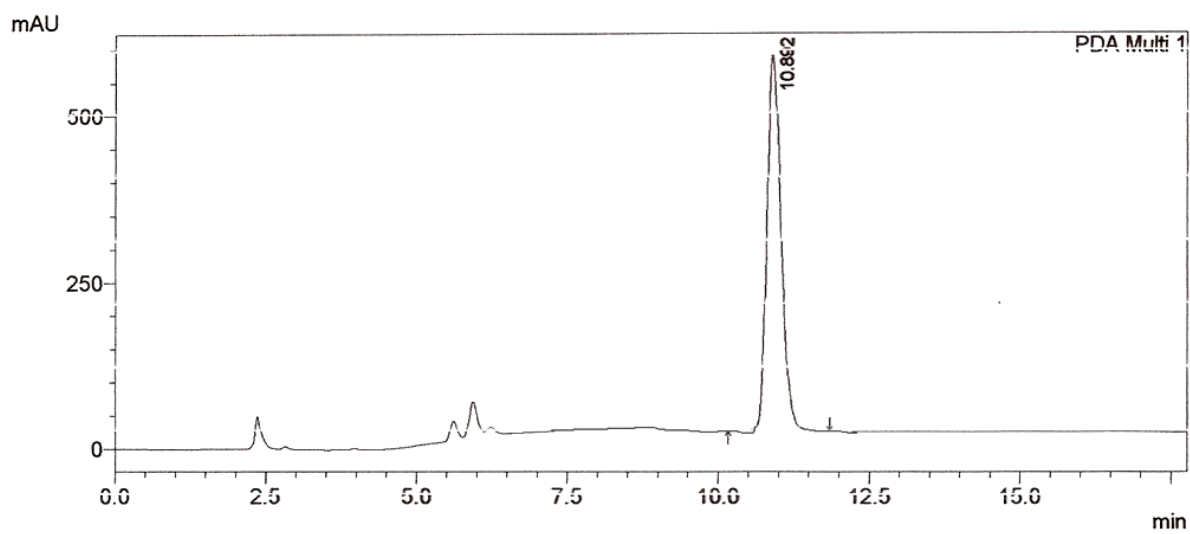


Cromatograma obtido por CLAE 1-(2-bromofenil)-etanol (**13b**)) t_R 7,2 (*S*) / 9,8 (*R*)

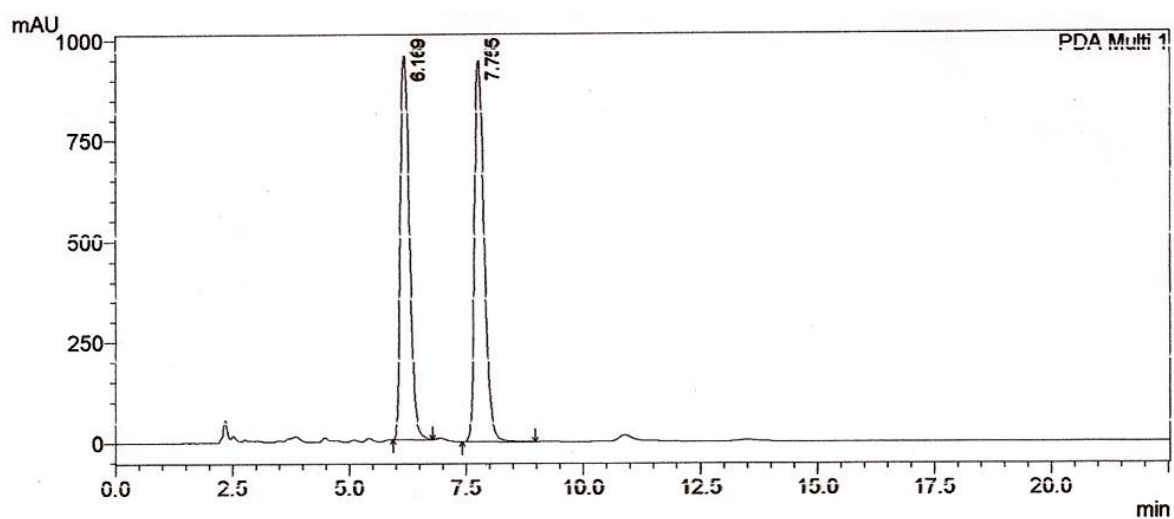
ANEXO 15



Espectro de RMN de ^1H (500 Hz, CDCl_3) do (\pm)-1-(2-clorofenil)-etanol (**15b**)

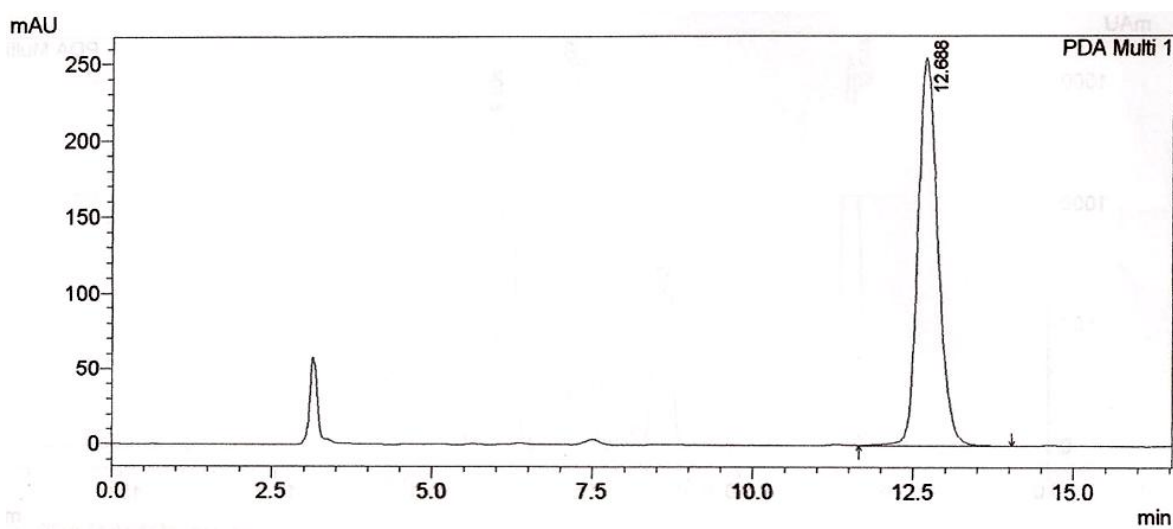
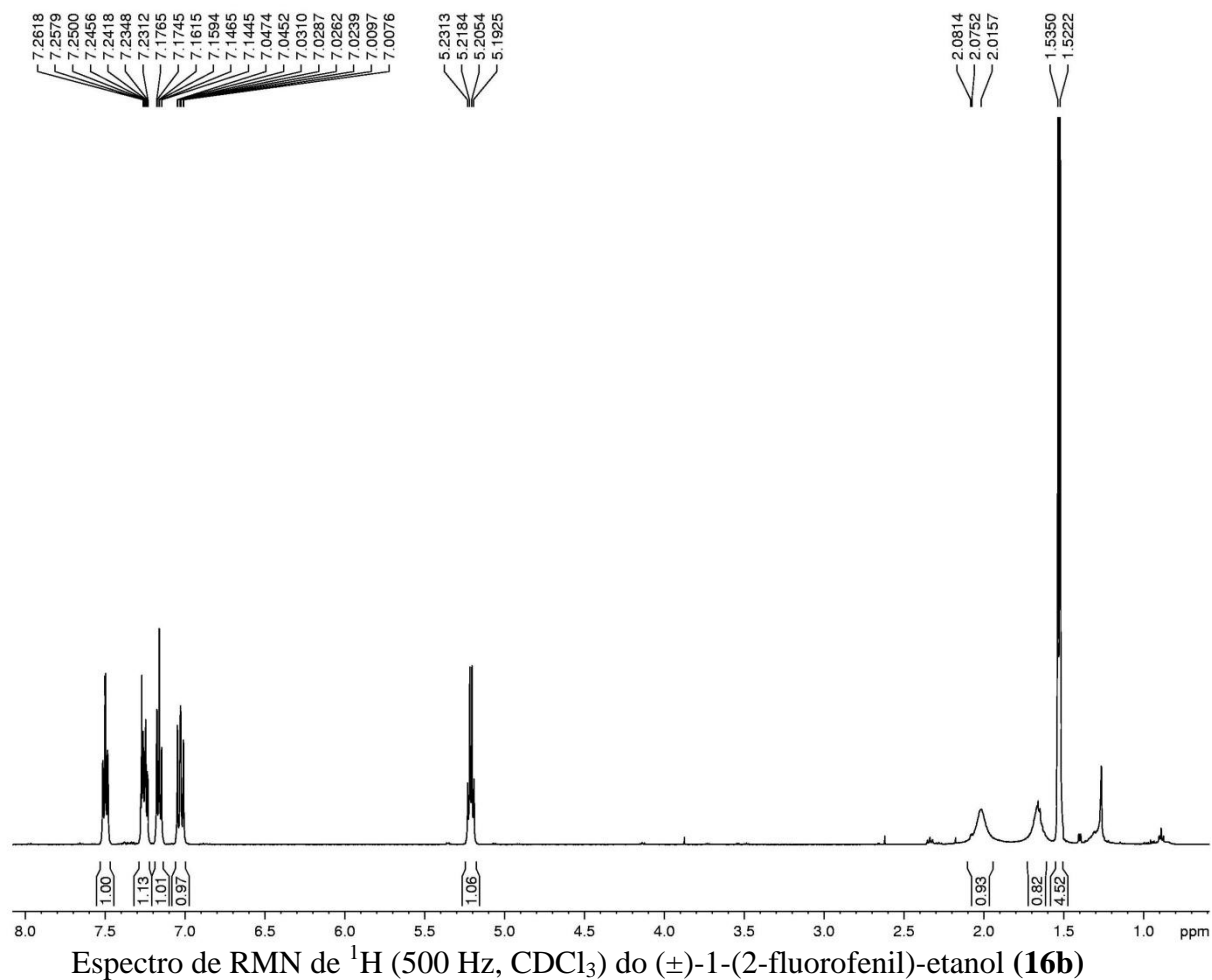


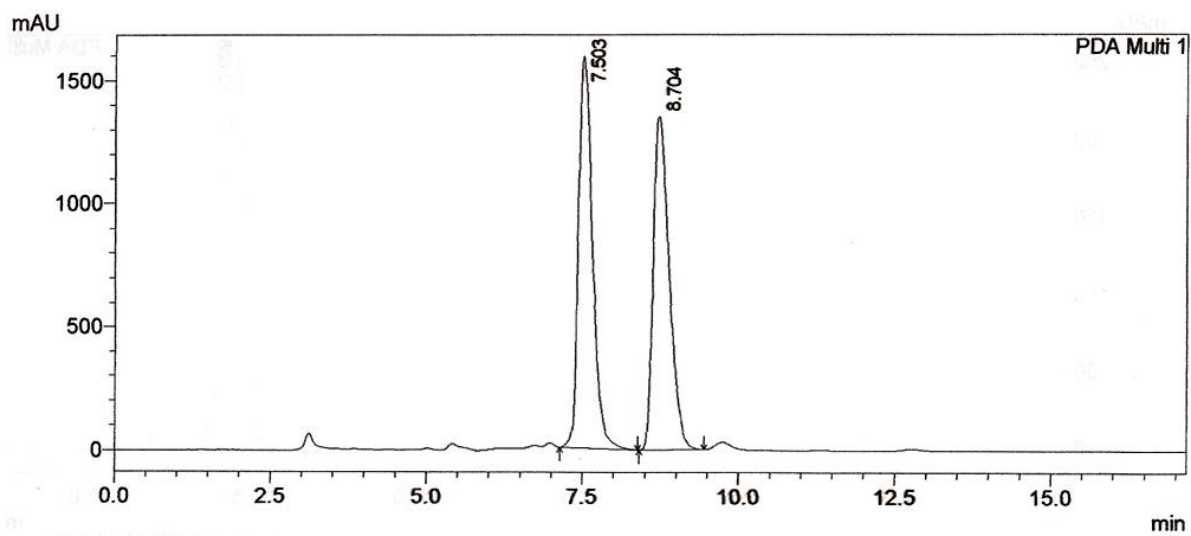
Cromatograma obtido por CLAE 2-cloro-acetofenona (**15a**)



Cromatograma obtido por CLAE 1-(2-clorofenil)-etanol (**15b**) t_R 6,1(S) / 7,7 (R)

ANEXO 16





Cromatograma obtido por CLAE 1-(2-fluorofenil)-etanol (**16b**)) t_R 7,5 (S) / 8,7 (R)

